# illumigene™ C. difficile

## DNA Amplification Assay for the Detection of Cytotoxigenic *C. difficile* in Stool Specimens

REF 280050    IVD In vitro diagnostic medical device

**INTENDED USE**

The ***illumi**gene C. difficile* DNA amplification assay, performed on the ***illumi**pro-10*, is a qualitative in vitro diagnostic test for the direct detection of toxigenic *C. difficile* in human stool specimens from patients suspected of having *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD).

The ***illumi**gene C. difficile* assay utilizes loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP)[1,2] technology to detect the pathogenicity locus (PaLoc)[3] of toxigenic *Clostridium difficile*. The *Clostridium difficile* PaLoc is a gene segment present in all known toxigenic *C. difficile* strains. The *C. difficile* PaLoc codes for both the Toxin A gene (*tcdA*) and the Toxin B gene (*tcdB*), has conserved border regions, and is found at the same site on the *C. difficile* genome for all toxigenic strains.[3] The ***illumi**gene C. difficile* assay detects the PaLoc by targeting a partial DNA fragment on the Toxin A gene. The *tcdA* target region was selected as an intact region remaining in all known A+B+ and A-B+ toxinotypes.

***illumi**gene C. difficile* is intended for use in hospital, reference or state laboratory settings. The device is not intended for point-of-care use.

**SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST**

The ***illumi**gene C. difficile* DNA molecular assay is based on loop-mediated amplification technology, which uses specifically designed primers to the PaLoc pathogenicity locus to provide for specific and continuous isothermal DNA amplification. A by-product of this amplification is the formation of magnesium pyrophosphate, which forms a white precipitate leading to a turbid reaction solution. This presence of turbidity signifies a positive reaction while the absence of turbidity represents a negative reaction. The ***illumi**gene C. difficile* assay contains primers that specifically amplify a 204 bp region of the conserved 5' sequence of the *tcdA* gene within the PaLoc of toxigenic *C. difficile* in diarrheal stool samples from patients suspected of having *C. difficile*-associated disease (CDAD). The results of the assay are determined using the Meridian ***illumi**pro-10* Incubator / Reader.

**BIOLOGICAL PRINCIPLES**

Toxigenic *Clostridium difficile* is a major cause of antibiotic associated diarrhea and colitis and is the causative agent for virtually all cases of pseudomembranous colitis. Although about 2% of normal healthy adults are colonized with *C. difficile*, many patients acquire this organism through nosocomial infection. Exposure to most antibiotics is thought to allow proliferation of toxigenic *C. difficile* by disrupting the normal intestinal flora. Two large toxin proteins (TcdA [or toxin A] and TcdB [toxin B]) are thought to be the primary virulence factors of *C. difficile*. These toxins are encoded by two separate genes, named *tcdA* and *tcdB*, respectively. Together, with three additional genes, they form a 19.6 kb pathogenicity locus called PaLoc.

**REAGENTS/MATERIALS PROVIDED**

***The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.***

1. ***illumi**gene* **C. difficile Sample Preparation Apparatus:** Sampling unit consisting of sample preparation chamber, dropper tip, cap and Sample Dilution Buffer (Phosphate Buffered Saline and formalin treated *Staphylococcus aureus*, with sodium azide (0.09%) as a preservative)
2. ***illumi**gene* **Reaction Buffer:** Tris-buffered solution containing sodium azide (0.09%)as a preservative
3. ***illumi**gene* ***C. difficile* Test Device:** Two separate chambers containing dry reagent lyospheres comprised of DNA polymerase, Deoxyribonucleoside Triphsophate (dNTPs), and either *C. difficile* specific primers (TEST Chamber) or *S. aureus* primers (CONTROL Chamber)
4. **Sample Collection Brushes**
5. ***illumi**gene* **Extraction Tubes**

**MATERIALS PROVIDED SEPARATELY**

***illumi**gene* External Control Kit, Catalog Number: 279920

**MATERIALS NOT PROVIDED**

1. Disposable latex gloves, powder free
2. DNAse/RNAse free, aerosol resistant pipette tips
3. Extraction Control (known positive clinical sample or a negative sample spiked with toxigenic *C. difficile*)

**EQUIPMENT NOT PROVIDED**

1. Dry-bath with 12 mm heat block capable of 95 C
2. Vortex mixer
3. Interval timer
4. Micropipette capable of dispensing 50 µL
5. Micropipette capable of dispensing 200 µL
6. ***illumi**pro-10*

**PRECAUTIONS**

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Follow Biosafety Level 2 and Good Laboratory practices during testing.[4] Treat all specimens and used Test Devices as capable of transmitting infectious agents. Do not eat, drink or smoke in areas where specimens or kit reagents are handled.
3. Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards.
4. Quality Control Programs for Molecular Testing Laboratories should be employed.[5]
5. ***illumi**gene* Sample Dilution Buffer contains formalin inactivated-organisms and should be treated as potentially infectious.
6. The ***illumi**gene C. difficile* Test Device contains lyophilized reagents. The protective pouch should not be open until ready to perform the assay.
7. The ***illumi**gene C. difficile* Test Device includes a latch feature that is designed to prevent contamination of the test area with amplification product. Do NOT use Test Devices with broken latches.
8. Dispose of used ***illumi**gene* Test Devices immediately after processing, leaving the device latch securely in place. Opening the device after amplification may result in contamination of the test area with amplification product.

**SHELF LIFE AND STORAGE**

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-27 C.

**SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

**Sample type:** Unformed samples indicative of CDAD.

**Human stool samples, unpreserved:** Samples should be transported and stored at 2-8 C prior to testing. Samples should be tested as soon as possible, but may be held up to 24 hours at 21-27 C or 5 days at 2-8 C. Samples that will not be tested within these times should be frozen immediately upon receipt and stored at ≤ -20 C until tested. Specimens may be frozen and thawed once.

**Human stool samples, preserved in Cary-Blair-based media:** Samples should be transported and stored at 2-8 C prior to testing. Samples should be tested as soon as possible, but may be held up to 5 days at 2-8 C. Samples that will not be tested within this time should be frozen immediately upon receipt and stored at ≤ -20 C until tested. Specimens may be frozen and thawed once.

**REAGENT PREPARATION**

Ensure kit reagents are at room temperature (21-27 C) before use. Incorrect results may be obtained if reagents are not brought to room temperature prior to use.

**SPECIMEN PREPARATION**

*NOTE:* Ensure that the ***illumi**pro-10* instrument is powered on and required performance verifications have been completed prior to initiation of SPECIMEN PREPARATION. Refer to the ***illumi**pro-10* Operator's Manual for further information regarding instrument set-up and operation.

1. Mix stool sample thoroughly.
2. Collect mixed sample specimen using Sample Collection Brush.
   a. Liquid Stool: Immerse Sample Collection Brush completely into specimen.
   b. Semi-solid Stool: Rotate Sample Collection Brush over specimen surface, lightly coating the surfaces of the brush bristles. Approximately one-half of the brush should be coated; over-collection of stool may lead to clogging of the sample collection device.
3. Add the Sample Collection Brush to the ***illumi**gene C. difficile* Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent and secure the cap. For stool in Cary-Blair-based media, transfer 200 µL of specimen to the ***illumi**gene C. difficile* Sample Preparation Apparatus and secure the cap. Vortex the Sample Preparation Apparatus for a minimum of 10 seconds. Specimen in ***illumi**gene C. difficile* Sample Preparation Apparatus prior to extraction may be held at 2-27 C for up to 24 hours prior to testing.
4. Remove the tip cap from the Sample Preparation Apparatus and squeeze five to ten drops of sample into a clean ***illumi**gene* Extraction Tube.
5. Repeat Sample Preparation Steps for all samples to be processed.
6. Heat the ***illumi**gene* Extraction Tubes containing mixed sample in a dry-bath/heat block at 95 C for 10 +/- 2 minutes.
7. Remove the tubes from the dry-bath/heat block and vortex for approximately 10 seconds. Extracted Samples may be held at 2-8 C for 4 hours OR may be frozen and stored at ≤ -20 C for 1 day prior to addition to Reaction Buffer. Extracted Samples may be frozen and thawed once.

**TEST PROCEDURE**

***This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.***

*NOTE:* A maximum of 10 samples can be processed in a single ***illumi**pro-10* run.

1. Transfer 50 µL of extracted sample to an appropriately labeled ***illumi**gene* Reaction Buffer tube.
2. Vortex the Reaction Buffer Tube containing extracted sample for approximately 10 seconds.
3. Repeat steps 1 and 2 for all the samples to be analyzed before proceeding.
4. Remove 1 ***illumi**gene C. difficile* Test Device from its protective pouch per sample. Carefully open the device, holding the tubes such that the lyophilized reagent will not fall out upon opening. Place device on a flat surface or in a rack that can accommodate the device.
5. Using a new pipette tip, transfer 50 µL from the Reaction Buffer tube containing extracted sample to the TEST chamber (White Bead) of the ***illumi**gene* Test Device. Do not insert air bubbles. Using a new pipette tip, transfer 50 µL from the Reaction Buffer tube containing extracted sample to the CONTROL chamber (Yellow Bead) of the ***illumi**gene* Test Device. Do not insert air bubbles. Close the ***illumi**gene* Test Device and fasten the latch securely.
6. Tap device on the bench top to mix and to remove air bubbles. Carefully examine the reaction tubes to ensure that there are no air bubbles left in the tube.
7. Insert the ***illumi**gene* Test Device into the ***illumi**pro-10* and initiate amplification reaction and detection. Results will be displayed at the conclusion of the run.

## INTERPRETATION OF RESULTS

| Sample ID | Reported Result | Interpretation |
|---|---|---|
| Patient Specimen | POSITIVE | Sample contains toxigenic *C. difficile* strain with the pathogen locus (PaLoc). |
| | NEGATIVE | No toxigenic *C. difficile* detected. |
| | INVALID | **No reportable result. Repeat the test using the original stool sample.** Inhibitory patient specimen, improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure. |
| Extraction Control | POSITIVE | Valid Extraction Control. Extractions performed correctly. |
| | NEGATIVE | **Extraction Failure. Do not report test result. Repeat the extraction process for all stool samples.** |
| | INVALID | **No reportable result. Do not report test result. Repeat the extraction process for all stool samples.** Inhibitory patient specimen, improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure. |
| Positive Control | POSITIVE | Valid positive control result. Reagents active at time of use, ***illumi**pro-10* performing correctly. |
| | NEGATIVE | **Incorrect control result.** Repeat control testing as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor. |
| | INVALID | **No reportable result. Repeat entire assay run using original stool samples.** Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure. |
| Negative Control | POSITIVE | **Incorrect control result.** Repeat control testing as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor. |
| | NEGATIVE | Valid negative control result. Reagents active at time of use, ***illumi**pro-10* performing correctly. |
| | INVALID | **No reportable result. Repeat entire assay run using original stool samples.** Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure. |
| EMPTY WELL | NONE | No ***illumi**gene* Test Device in the ***illumi**pro-10* Well. **OR** The ***illumi**gene* Test Device present is compromised due to sample preparation failure, dirty device or improperly seated device. **Repeat the test using original sample.** |

## QUALITY CONTROL

1. Each device contains an internal control well that controls for amplification inhibition, assay reagents and sample processing effectiveness.
2. Good laboratory practice recommends the use of control materials. Users should follow the appropriate federal, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.
3. ***illumi**gene C. difficile* External Control Reagents are supplied separately (Catalog 279920). It is recommended that the reactivity of each new lot and each new shipment of ***illumi**gene C. difficile* be verified on receipt and before use. External control tests should be performed thereafter in accordance with appropriate federal, state and local guidelines. The ***illumi**gene C. difficile* test kit should not be used in patient testing if the external controls do not produce the correct results.
4. A separate device must be used for each external control reagent.
5. DO NOT extract the Positive or Negative Control samples.
6. An Extraction Control (a known positive or clinical sample or negative sample spiked with toxigenic *C. difficile*) should be included in each extraction run. The Extraction Control should be treated as a sample.

## EXPECTED VALUES

The frequency of antibiotic-associated diarrhea caused by *C. difficile* is dependent on several factors, including patient population, type of institution and epidemiology. The incidence of CDAD in patients suspected of having antibiotic-associated disease is 15-20% although different facilities may find positive rates above or below this range.[6] The incidence of toxinogenic *C. difficile* during the 2010 period of this study was 15.5%.

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. Assay does not distinguish between viable and non-viable organisms.
2. Test results are to be used in conjunction with information available from the patient clinical evaluation and other diagnostic procedures.
3. This test is for use with unformed stool samples, preserved or unpreserved, only. Performance characteristic of other clinical specimens types have not been established.
4. The performance characteristics for specimens from patients less than two years of age have not been established.
5. Two distinct groups have been identified that can harbor *C. difficile* asymptomatically at very high rates. Colonization at rates up to 50% and higher have been reported in infants and rates up to 32% in cystic fibrosis patients.[7,8]
6. This assay does not identify antimicrobial susceptibility.
7. This test detects but does not differentiate the NAP1 (Ribotype 027) strain from other toxingenic strains of *C. difficile*.
8. The detection of bacterial nucleic acid is dependent on proper specimen collection, handling (including transportation and storage) and preparation (dilution and extraction). Failure to follow instructions for collection, handling and preparation may cause incorrect results.

## SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

***illumi**gene C. difficile* was evaluated in 2010 by four independent clinical test sites located in the Midwestern and Southern regions of the United States and the manufacturer. Overall performance information is shown in Table 1.

**Table 1. Overall performance data**

| Cytotoxic bacterial culture | ***illumi**gene C. difficile* | | |
|---|---|---|---|
| | **Positive** | **Negative** | **Total** |
| **Positive** | 99 | 5** | 104 |
| **Negative** | 27* | 546 | 573 |
| **Total** | 126 | 551 | 677 |
| | | | **95% CI** |
| **Sensitivity** | 99/104 | **95.2%** | 89.2 - 97.9% |
| **Specificity** | 546/573 | **95.3%** | 93.2 - 96.7% |
| **Correlation** | 645/677 | **95.3%** | 93.4 - 96.6% |

* 15/27 false positive results were positive by another FDA cleared molecular assay. Of the remaining 12 false positive results, 8 were positive by a FDA cleared assay for the detection of GDH.
** 2/5 false negative results were negative by another FDA cleared molecular assay

A total of 697 qualified patient samples were evaluated. Samples were collected from 274 (39.3%) males and 419 (60.1%) females. In the case of 4 (0.6%) of the patients, sex was not known. The age groups of patients range from 2 years of age to 96 years of age. No differences in test performance were observed based on patient age or sex. Tables 2 and 4 show the assay performance by clinical site and patient age; Table 3 summarizes invalid rate information by site.

**Table 2. Performance characteristics by site**

| Site | Positive Samples | | | Negative Samples | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***illumi**gene* / Cytotoxic bacterial culture | Sensitivity % | 95% CI | ***illumi**gene* / Cytotoxic bacterial culture | Specificity % | 95% CI |
| **Total** | **99/104**** | **95.2%** | **89.2 – 97.9%** | **546/573*** | **95.3%** | **93.2 – 96.7%** |
| Site 1 | 4/5 | 80.0% | 37.6 – 96.4% | 58/60 | 97.6% | 88.6 – 99.1% |
| Site 2 | 12/12 | 100% | 75.7 – 100% | 62/67 | 92.5% | 83.7 – 96.8% |
| Site 3 | 20/20 | 100% | 83.9 – 100% | 87/92 | 94.6% | 87.9 – 97.7% |
| Site 4 | 8/8 | 100% | 67.6 – 100% | 36/39 | 92.3% | 79.7 – 97.3% |
| Site 5 | 55/59 | 93.2% | 83.8 – 97.3% | 303/315 | 96.2% | 93.5 – 97.8% |

**Table 3. Invalid rates by site**

| Site | Clinical Site Evaluation | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Total Invalids | Assay Invalids | Instrument Invalids | Invalid Rate |
| Site 1 | 3 | 3 | 0 | 3/68 (4.4%) |
| Site 2 | 1 | 0 | 1 | 1/80 (1.3%) |
| Site 3 | 8 | 1 | 7 | 8/120 (6.7%) |
| Site 4 | 1 | 1 | 0 | 1/48 (2.1%) |
| Site 5 | 7 | 6 | 1 | 7/381 (1.8%) |
| **Total** | **20** | **11/697 (1.6%)*** ** | **9/697 (1.3%)** | **20/697 (2.9%)** |

*** 1 Specimen remained invalid after repeat testing from the original sample.

**Table 4. Results by patient age**

| Patient age | Positive Samples | | | Negative Samples | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***illumi**gene* / Toxigenic culture | Sensitivity % | 95% CI | ***illumi**gene* / Toxigenic culture | Specificity % | 95% CI |
| ≥ 2 - 12 years | 10/11 | 90.9% | 62.3 – 98.4% | 75/79 | 94.9% | 87.7 – 98.0% |
| > 12 to 21 years | 5/5 | 100% | 56.6 – 100% | 53/56 | 94.6% | 85.4 – 98.2% |
| > 21 years | 83/87 | 95.4% | 88.8 – 98.2% | 417/437 | 95.4% | 93.0 – 97.0% |
| Age Unknown | 1/1 | 100% | 20.7 – 100% | 1/1 | 100% | 20.7 – 100% |

**ANALYTICAL SENSITIVITY**
The analytical sensitivity of this assay for *C. difficile* was based on 20 replicates for each measurand and with a stated probability (eg, 95% where 19/20 replicates are positive) of obtaining positive responses at the following levels of the measurands:

| Strain ID | Toxinotype | Phenotype | LoD/Test |
|---|---|---|---|
| VPI 10463 | 0 | A+/B+ | 4 CFU/test |
| 2007431 | III (NAP1) | A+/B+ | 32 CFU/test |
| CFI | VIII | A-/B+ | 64 CFU/test |
| 2006240 | V (NAP7) | A+/B+ | 32 CFU/test |
| BI8 | III | A+/B+ | 64 CFU/test |
| 2007858 | IX/XXIII | A+/B+ | 32 CFU/test |
| 8864 | X | A-/B+ | 64 CFU/test |

**ASSAY REACTIVITY**
The following *C. difficile* stock cultures from different sources were tested and produced positive reactions at 64 CFU/test with ***illumi**gene C. difficile*:
Type 0: Strains 10463, 2004111, 2004205, 2005070, 2005257, 2008029, 2008162, 2008341, 2008351, 2009066, 2009099, B1, G1, J7, K12, Y1; Type III: 2004052, 2004118, 2007431, BI17, BI8; Type V: 2005325, 2006240, 2008188, 2009018, 2009065, BK6; Type VIII: 43598, 2008016, CF1; Type X 8864; Type XII 2007435; Type IX/XXIII 2007858; Unknown Type 2009132, 2009155, 2009277.

**REPRODUCIBILITY**
Blind coded panels of 10 samples were supplied to three independent laboratories for precision studies. Samples were randomly sorted within each panel to mask sample identities. The panels included contrived samples manufactured at the assay limit of detection (n = 3) and just below the limit of blank (ie, high negative sample, n = 3). The panels also included uncharacterized positive (n = 2) and negative (n = 2) samples. Testing was performed by different operators at each site on the same day (intra-assay variability) for five days (inter-assay variability). Three lots of ***illumi**gene C difficile* were used in this study. The results are given in the table below:

| | Site 1 | | Site 2 | | Site 3 | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Sample Type** | **Percent agreement** | | **Percent agreement** | | **Percent agreement** | | **Percent agreement** | |
| Negative | 20/20 | 100% | 20/20 | 100% | 19/19**** | 100% | 59/59 | 100% |
| High Negative | 25/30 | 83% | 29/30 | 97% | 28/30 | 93% | 82/90 | 91% |
| Low Positive | 30/30 | 100% | 30/30 | 100% | 30/30 | 100% | 90/90 | 100% |
| Positive | 20/20 | 100% | 20/20 | 100% | 20/20 | 100% | 60/60 | 100% |

**** 1 specimen generated an instrument invalid test result.

**CROSSREACTIVITY STUDIES**
Crossreactivity studies were performed with positive and negative stool specimens inoculated with bacterial or fungal organisms to a final concentration of $1.2 \times 10^8$ or virus at a minimum of $1 \times 10^{5.06}$ $TCID_{50}$/mL. None of the following organisms in stool reacted with ***illumi**gene C. difficile*:
*Aeromonas hydrophila, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Citrobacter freundii, Clostridium sordellii, Clostridium perfringens, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Escherichia coli O157:H7, Escherichia fergusonii, Escherichia hermannii, Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Lactococcus lactis, Listeria monocytogenes, Peptostreptococcus anaerobius, Plesiomonas shigelloides, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Salmonella* Groups B-E, *Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Shigella boydii, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica,* Adenovirus Types 40 and 41, Coxsackievirus, Echovirus, Rotavirus.

**TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES**
The following substances, at the specified saturated solvent/diluents concentrations, do not interfere with test results in the final concentrations listed: Barium sulfate (5 mg/mL), fecal fat (equivalent to 2.65 mg stearic plus 1.3 mg palmitic acids per mL), hemoglobin (as methemoglobin) (3.2 mg/mL), IgA (5 mg/mL), Imodium AD® (0.00667 mg/mL), Kaopectate® (0.87 mg/mL), Metronidazole (12.5 mg/mL), mucin (3.33 mg/mL) Mylanta® (4.2 mg/mL), Pepto-Bismol® (0.87 mg/mL), Prilosec® (0.5 mg/mL), Tagamet® (0.5 mg/mL), TUMS® (0.5 mg/mL), Vancomycin (12.5 mg/mL), white blood cells (5% V/V), whole blood (5% V/V).

**ITALIANO**

# *illumigene*™ *C. difficile*

## Test di Amplificazione di DNA per il rilevamento di *C. difficile* citotossigenico in campioni fecali

REF **280050** IVD **Dispositivo medico-diagnostico in vitro**

**FINALITÀ D'USO**
Il test di amplificzione di DNA ***illumi**gene C. difficile*, eseguito sul sistema ***illumi**pro-10*, è un test qualitativo diagnostico in vitro per il rilevamento diretto di *C. difficile* tossigenico in campioni di feci umane provenienti da pazienti con sospetta diarrea associata a *Clostridium difficile* (CDAD).

Il test ***illumi**gene C. difficile* utilizza la tecnica LAMP (loop-mediated isothermal DNA amplification, amplificazione isotermica di DNA loop-mediata)[1,2] per rilevare il locus di patogenicità (PaLoc)[3] di *Clostridium difficile* tossigenico. Il PaLoc di *Clostridium difficile* è un segmento di gene presente in tutti i ceppi tossigenici noti di *C. difficile*. Il PaLoc di *C. difficile* codifica entrambi i geni della Tossina A (tcdA) e della Tossina B (tcdB), ha regioni terminali conservate e si trova nello stessa posizione sul genoma di *C. difficile* in tutti i ceppi tossigenici.[3] Il test ***illumi**gene C. difficile* rileva il PaLoc identificando un frammento parziale di DNA sul gene della Tossina. La regione target tcdA è stata selezionata come regione conservata presente in tutti i tossinotipi conosciuti A+B+ e A-B+.

***illumi**gene C. difficile* è da utilizzarsi in laboratori ospedalieri, di riferimento o statali. Il dispositivo non va utilizzato come sistema di diagnostica decentralizzata.

**SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST**
Il test per l'analisi molecolare del DNA ***illumi**gene C. difficile* è basato sulla tecnica di amplificazione isotermica loop-mediata, o tecnica LAMP, che utilizza primer specificamente designati per il locus di patogenicità PaLoc allo scopo di fornire un'amplificazione isotermica continua e specifica del DNA. Un sotto-prodotto di questa amplificazione è la formazione di magnesio pirofosfato, che forma un precipitato bianco, rendendo torbida la soluzione di reazione. Questa presenza di torbidità indica una reazione positiva, mentre l'assenza di torbidità indica una reazione negativa. Il test ***illumi**gene C. difficile* contiene primer che amplificano specificatamente una regione di 204 bp della sequenza conservata in 5' del gene *tcdA* all'interno del PaLoc di *C. difficile* tossigenico in campioni fecali diarroici di pazienti con sospetta diarrea associata a *C. difficile* (CDAD). I risultati dell'analisi sono determinati mediante l'utilizzo dell'incubatore/lettore Meridian ***illumi**pro-10*.

**PRINCIPI BIOLOGICI**
Il *Clostridium difficile* tossigenico è una delle cause principali di malattie diarroiche e coliti associate agli antibiotici ed è l'agente scatenante di quasi tutti i casi di colite pseudomembranosa. Sebbene circa il 2% degli adulti sani sia colonizzato da *C. difficile*, molti pazienti acquisiscono questo organismo a seguito di infezione nosocomiale. Si ritiene che l'esposizione alla maggior parte degli antibiotici favorisca la proliferazione di *C. difficile* tossigenico distruggendo l'equilibrio della normale flora intestinale. Si ritiene che due grandi tossine proteiche (TcdA [o tossina A] e TcdB [tossina B]) siano i fattori primari della virulenza del *C. difficile*. Queste tossine sono codificate da due geni differenti, chiamati rispettivamente *tcdA* e *tcdB*. Insieme con altri tre geni formano il locus di patogenicità di 19,6 kb chiamato PaLoc.

**REAGENTI/MATERIALI FORNITI**
***Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.***
1. **Dispositivo per la preparazione dei campioni *illumi*gene *C. difficile*:** unità per la raccolta del campione costituita da unità per la preparazione del campione, contagocce, tappo e Tampone di diluizione del campione (soluzione tampone fosfato e *Staphylococcus aureus* fissato in formalina, con sodio azide (0,09%) come conservante)
2. **Tampone di reazione *illumi*gene:** soluzione tampone Tris contenente sodio azide (0,09%) come conservante
3. **Dispositivo di analisi *illumi*gene *C. difficile*:** due provette separate contenenti granuli liofilizzati di reagente composto da DNA polimerasi, deossiribonucleoside trifosfato (dNTP) e primer specifici per *C. difficile* (provetta TEST) o primer per *S. aureus* (provetta CONTROLLO)
4. **Spazzolini per la raccolta dei campioni**
5. **Provette per l'estrazione *illumi*gene**

**MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE**
Kit di controllo esterno ***illumi**gene*, Numero di catalogo: 279920

**MATERIALI NON FORNITI**
1. Guanti di lattice monouso senza talco
2. Puntali per pipette privi di DNAse/RNAse e resistenti alla contaminazione da aerosol
3. Controllo di estrazione (campione clinico noto positivo o campione negativo inoculato con *C. difficile* tossigenico)

**DISPOSITIVI NON FORNITI**
1. Blocco termostatico a secco con pozzetti da 12 mm, temperatura massima di 95 C
2. Vortex
3. Timer

4. Micropipetta in grado di dispensare 50 µL
5. Micropipetta in grado di dispensare 200 µL
6. ***illumi**pro-10*

**PRECAUZIONI**
1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. Seguire le buone pratiche di laboratorio e il livello 2 di biosicurezza durante l'analisi.[4] Trattare tutti i campioni ed i dispositivi test come in grado di trasmettere agenti infettivi. Non mangiare, bere o fumare nelle aree dove si maneggiano i campioni o i reagenti del kit.
3. Indossare guanti monouso quando si maneggiano i campioni e in seguito lavarsi le mani con cura.
4. Applicare i requisiti indicati nei Programmi di controllo di qualità per i laboratori di diagnostica molecolare.[5]
5. **Il tampone di diluizione del campione *illumi*gene** contiene organismi inattivati in formalina e deve essere trattato come potenzialmente infettivo.
6. Il dispositivo di analisi ***illumi**gene C. difficile* contiene reagenti liofilizzati. Non aprire la busta di protezione finché non si è pronti ad eseguire l'analisi.
7. Il dispositivo di analisi ***illumi**gene C. difficile* include una linguetta di chiusura progettata per evitare la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione. NON usare dispositivi di analisi con linguette danneggiate.
8. Eliminare i dispositivi di analisi ***illumi**gene* subito dopo l'uso, lasciando chiuse le linguette. L'apertura del dispositivo dopo l'amplificazione può causare la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione.

**STABILITÀ E CONSERVAZIONE**
La data di scadenza è indicata sull'etichetta del kit. Conservare il kit ad una temperatura compresa fra 2 e 27 C.

**RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**
**Tipo di campione:** campioni non formati indicativi di CDAD.

**Campioni di feci umane, senza conservanti:** i campioni devono essere trasportati e conservati a 2-8 C prima dell'analisi. I campioni devono essere analizzati il prima possibile, ma possono essere conservati fino a 24 ore a 21-27 C o a 5 giorni a 2-8 C. I campioni che non saranno analizzati entro questi tempi devono essere congelati immediatamente dopo l'arrivo e e conservati a ≤ -20 C fino al momento dell'analisi. I campioni possono essere congelati e scongelati una volta.

**Campioni di feci umane, conservati in terreno in base Cary-Blair:** i campioni devono essere trasportati e conservati a 2-8 C prima dell'analisi. I campioni devono essere analizzati il prima possibile, ma possono essere conservati fino a un massimo di 5 giorni ad una temperatura compresa fra 2 e 8 C. I campioni che non possono essere analizzati entro questo tempo devono essere congelati immediatamente dopo l'arrivo e conservarli a ≤ -20 C fino al momento dell'analisi. I campioni possono essere congelati e scongelati una volta.

**PREPARAZIONE DEI REAGENTI**
Prima dell'uso, accertarsi che i reagenti del kit raggiungano temperatura ambiente (21-27 C). Possono verificarsi risultati incorretti se i reagenti di controllo non sono stati portati a temperatura ambiente prima dell'uso.

**PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**
*NOTA:* accertarsi che l'apparecchio ***illumi**pro-10* sia acceso e le verifiche di funzionamento siano state eseguite prima di avviare la procedura di PREPARAZIONE DEI CAMPIONI. Consultare il Manuale dell'Operatore ***illumi**pro-10* per ulteriori informazioni sulla preparazione e il funzionamento dell'apparecchio.
1. Miscelare bene il campione fecale.
2. Raccogliere il campione miscelato utilizzando lo spazzolino per la raccolta dei campioni.
   a. Feci liquide: immergere completamente lo spazzolino nel campione.
   b. Feci semisolide: ruotare lo spazzolino per la raccolta del campione sulla superficie del campione, in modo che il campione copra leggermente le setole dello spazzolino. Ricoprire approssimativamente metà dello spazzolino; una quantità eccessiva di campione può intasare il dispositivo di raccolta del campione.
3. Inserire lo spazzolino per la raccolta del campione nel dispositivo per la preparazione del campione ***illumi**gene C. difficile* contenente il diluente del campione chiudere bene il tappo. Per feci in terreno in base Cary-Blair, trasferire 200 µL di campione nel dispositivo per la preparazione del campione ***illumi**gene C. difficile* e chiudere bene il tappo. Agitare il dipositivo per la preparazione del campione con il vortex per almeno 10 secondi. Prima dell'estrazione il campione nel dispositivo di preparazione del campione ***illumi**gene C. difficile* può essere conservato a 2-27 C fino a 24 ore prima dell'analisi.
4. Rimuovere il tappo dalla punta del dispositivo per la preparazione dei campioni e premere sui lati per dispensare da cinque a dieci gocce di campione in una provetta di estrazione ***illumi**gene* pulita.
5. Ripetere le fasi di preparazione del campione per tutti i campioni da analizzare.
6. Riscaldare le provette di estrazione ***illumi**gene* contenenti il campione miscelato inserendole in un bagno a secco/termostatico a 95 C per 10 +/- 2 minuti.
7. Togliere le provette dal bagno a secco/termostatico e agitarle con il vortex per almeno 10 secondi. I campioni estratti possono essere conservati a 2-8 C per 4 ore O possono essere congelati e conservati a ≤ -20 C per 1 giorno prima dell'aggiunta al buffer di reazione. I campioni possono essere congelati e scongelati una volta.

**PROCEDURA DEL TEST**
***Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, statali, nazionali o dagli enti di accreditamento.***
*NOTA:* in un unico ciclo ***illumi**pro-10* si possono analizzare massimo dieci campioni.
1. Trasferire 50 µL di campione estratto in una provetta con il tampone di reazione ***illumi**gene* adeguatamente etichettata.
2. Agitare con il vortex la provetta con il tampone di reazione contenente il campione estratto per circa 10 secondi.
3. Prima di continuare, ripetere i punti 1 e 2 per tutti i campioni da analizzare.
4. Estrarre dalla busta di protezione un dispositivo di analisi ***illumi**gene C. difficile* per ciascun campione da analizzare. Aprire il dispositivo con attenzione, maneggiando le provette in modo da evitare la dispersione del reagente liofilizzato dopo l'apertura. Porre il dispositivo su una superficie piana o inserirlo in un portaprovette di misura adeguata.
5. Utilizzando un nuovo puntale per pipette, trasferire 50 µL dalla provetta con il tampone di reazione contenente il campione estratto nella provetta TEST (sfera bianca) del dispositivo di analisi ***illumi**gene*. Evitare di inserire bolle d'aria. Utilizzando un nuovo puntale per pipette, trasferire 50 µL dalla provetta di reazione contenente il campione estratto nella provetta CONTROLLO (sfera gialla) del dispositivo ***illumi**gene*. Evitare di inserire bolle d'aria. Chiudere il dispositivo di analisi ***illumi**gene* fissando bene la linguetta di chiusura.
6. Picchiettare il dispositivo sulla superficie di lavoro per miscelarne il contenuto e rimuovere eventuali bolle d'aria. Esaminare attentamente le provette di reazione per assicurarsi che non siano rimaste bolle d'aria nella provetta.
7. Inserire il dispositivo di analisi ***illumi**gene* nello strumento ***illumi**pro-10* e dare inizio alla reazione di amplificazione e rilevamento. I risultati saranno visualizzati alla fine del ciclo.

**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

| Identificativo del campione | Risultato Riportato | Interpretazione |
|---|---|---|
| Campione del Paziente | POSITIVO | Il campione contiene il ceppo *C. difficile* tossigenico con il locus patogeno (PaLoc). |
| | NEGATIVO | Nessun *C. difficile* tossigenico rilevato. |
| | NON VALIDO | **Nessun risultato refertabile. Ripetere l'analisi utilizzando il campione fecale originale.** Campione del paziente con effetto inibitorio, preparazione del campione errata, deterioramento del reagente, fallimento dello strumento o fallimento del controllo interno. |
| Controllo di Estrazione | POSITIVO | Controllo di Estrazione valido. Estrazioni eseguite correttamente. |
| | NEGATIVO | **Fallimento dell'Estrazione. Non refertare il risultato del test. Ripetere il procedimento di estrazione per tutti i campioni fecali.** |
| | NON VALIDO | **Nessun risultato refertabile. Non refertare il risultato del test. Ripetere il procedimento di estrazione per tutti i campioni fecali.** Campione del paziente con effetto inibitorio, preparazione del campione errata, deterioramento del reagente, fallimento dello strumento o fallimento del controllo interno. |
| Controllo Positivo | POSITIVO | Risultato del controllo positive valido. I reagenti sono reattivi al momento dell'utilizzo, l'***illumi**pro-10* funziona correttamente. |
| | NEGATIVO | **Risultato del controllo non corretto.** Ripetere l'analisi del controllo come prima verifica per identificare la causa dell'insuccesso. Se si ripetono risultati non corretti contattare il servizio di assistenza tecnica Meridian oppure il distributore locale.. |
| | NON VALIDO | **Nessun risultato refertabile. Ripetere l'analisi dall'inizio utilizzando i campioni fecali originali.** Preparazione del campione errata, deterioramento del reagente, fallimento dello strumento o fallimento del controllo interno |
| Controllo Negativo | POSITIVO | **Risultato del controllo non corretto.** Ripetere l'analisi del controllo come prima verifica per identificare la causa dell'insuccesso. Se si ripetono risultati non corretti contattare il servizio di assistenza tecnica Meridian oppure il distributore locale. |
| | NEGATIVO | Risultato del controllo negative valido. I reagenti sono reattivi al momento dell'utilizzo, l'***illumi**pro-10* funziona correttamente |
| | NON VALIDO | **Nessun risultato refertabile. Ripetere l'analisi dall'inizio utilizzando i campioni fecali originali.** Preparazione del campione errata, deterioramento del reagente, fallimento dello strumento o fallimento del controllo interno |
| POZZETTO VUOTO | NESSUNO | Nessun dispositivo di analisi ***illumi**gene* nel pozzetto dell'***illumi**pro-10*. **O** Il dispositivo di analisi ***illumi**gene* presente è compromesso a causa dell' errata preparazione del campione, dispositivo sporco o impropriamente alloggiato. Ripetere il test utilizzando il campione originale. |

## CONTROLLO QUALITÀ

1. Ciascun dispositivo contiene un controllo interno che verifica l'eventuale inibizione dell'amplificazione e l'efficacia dei reagenti e dell'analisi dei campioni.
2. Una buona pratica di laboratorio richiede l'uso dei reagenti di controllo. Gli utenti devono attenersi alle linee guida vigenti locali, statali e nazionali per l'esecuzione dell'analisi dei controlli di qualità esterni.
3. I reagenti del controllo esterno ***illumi**gene C. difficile* sono forniti separatamente (numero di catalogo 279920). La reattività di ciascun nuovo lotto e ciascuna nuova spedizione di ***illumi**gene C. difficile* deve essere verificata alla consegna e prima dell'uso. Le analisi del controllo esterno devono essere eseguite quindi in accordo con le linee guida vigenti locali, statali e nazionali. Il test del kit ***illumi**gene C. difficile* non deve essere usato per l'analisi del paziente se I controlli esterni non producono i risultati corretti.
4. Un dispositivo differente deve essere utilizzato per ciascun reagente di controllo esterno.
5. NON estrarre i campioni del Controllo Positivo o Negativo.
6. Un Controllo di Estrazione (campione clinico noto positivo o campione negativo inoculato con *C. difficile* tossigenico) dovrebbe essere incluso in ogni fase di estrazione. Il controllo di estrazione deve essere trattato come un campione.

## VALORI ATTESI

La frequenza d'insorgenza di diarrea associata agli antibiotici causata da *C. difficile* dipende da differenti fattori tra cui la popolazione dei pazienti, il tipo di istituto e l'epidemiologia. L'incidenza di infezioni associate a *C. difficile* (CDAD) in pazienti sospetti di avere patologie associate a terapia antibiotica è del 15-20% sebbene in differenti strutture si possono rilevare percentuali al di sotto o al di sopra di tale intervallo.[6] L'incidenza di *C. difficile* tossigenico durante il periodo 2010 di questo studio è stata pari al 15,5%.

## LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Il test non fa distinzione fra organismi vitali e non vitali.
2. I risultati del test devono essere utilizzati insieme alle informazioni ricavate dall'esame clinico del paziente e da altre procedure diagnostiche.
3. Questo test è per uso esclusivo con campioni fecali non formati, con conservante o senza conservante. Le prestazioni del test non sono state stabilite con altri tipi di campioni clinici.
4. Le prestazioni del test per campioni di pazienti con età inferiore a due anni non ono state stabilite.
5. Due distinti gruppi sono stati identificati come portatori asintomatici a elevate percentuali. Colonizzazioni a percentuali fino al 50% e oltre sono state osservate nei bambini e percentuali fino al 32% nei pazienti con fibrosi cistica.[7,8]
6. Questo test non identifica la suscettibilità antimicrobica.
7. Questo test rileva ma non distingue il ceppo NAP1 (Ribotipo 027) da altri ceppi tossigenici di *C. difficile*.
8. Il rilevamento di acido nucleico batterico è dipendente dalla raccolta idonea del campione, dalla manipolazione (includendo il trasporto e la conservazione) e la preparazione (diluizione ed estrazione). Risultati non corretti possono essere osservati nel caso non si seguano le istruzioni per la raccolta, la manipolazione e la preparazione.

## PRESTAZIONI SPECIFICHE

***illumi**gene C. difficile* è stato valutato nel 2010 da quattro laboratori clinici indipendenti situati nel Midwest e nel sud degli Stati Uniti e dal produttore. L'informazione globale delle prestazioni è mostrata in Tabella 1.

**Tabella 1. Risultati globali delle prestazioni**

| Coltura batterica citotossica | ***illumi**gene C. difficile* | | |
|---|---|---|---|
| | **Positivo** | **Negativo** | **Totale** |
| **Positivo** | 99 | 5** | 104 |
| **Negativo** | 27* | 546 | 573 |
| **Totale** | 126 | 551 | 677 |
| | | | **95% CI** |
| **Sensibilità** | 99/104 | **95,2%** | 89,2 – 97,9% |
| **Specificità** | 546/573 | **95,3%** | 93,2 – 96,7% |
| **Correlazione** | 645/677 | **95,3%** | 93,4 – 96,6% |

* 15/27 risultati falsi positivi erano positivi ad un altro test molecolare approvato FDA (Food and Drug Administration). Dei rimanenti 12 risultati falsi positivi, 8 erano positivi ad un test approvato FDA per il rilevamento di GDH.
** 2/5 risultati falsi positivi erano negativi ad un altro test molecolare approvato FDA

Sono stati valutati un totale di 697 campioni di pazienti qualificati. I campioni sono stati raccolti da 274 (39,3%) uomini e 419 (60,1%) donne. In 4 (0,6%) casi dei pazienti, il sesso non era noto. I gruppi di età dei pazienti variavano da 2 anni a 96 anni. Non sono state osservate differenze nelle prestazioni del test in base all'età o al sesso dei pazienti. Le tabelle 2 e 4 mostrano le prestazioni del test per sito clinico ed età del paziente; la tabella 3 riassume l'informazione della percentuale dei risultati non validi per sito.

**Tabella 2. Caratteristiche delle prestazioni per sito**

| Sito | Campioni Positivi | | | Campioni Negativi | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***illumi**gene* / coltura batterica citotossica | Sensibilità % | 95% CI | ***illumi**gene* / coltura batterica citotossica | Specificità % | 95% CI |
| **Totale** | **99/104**** | **95,2%** | **89,2 – 97,9%** | **546/573*** | **95,3%** | **93,2 – 96,7%** |
| Sito 1 | 4/5 | 80,0% | 37,6 – 96,4% | 58/60 | 97,6% | 88,6 – 99,1% |
| Sito 2 | 12/12 | 100% | 75,7 – 100% | 62/67 | 92,5% | 83,7 – 96,8% |
| Sito 3 | 20/20 | 100% | 83,9 – 100% | 87/92 | 94,6% | 87,9 – 97,7% |
| Sito 4 | 8/8 | 100% | 67,6 – 100% | 36/39 | 92,3% | 79,7 – 97,3% |
| Sito 5 | 55/59 | 93,2% | 83,8 – 97,3% | 303/315 | 96,2% | 93,5 – 97,8% |

**Tabella 3. Percentuale di Risultati Non Validi per sito**

| Sito | Valutazione del sito clinico | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Totale Non Validi | Non Validi al test | Errore dello strumento | Percentuale Non Validi |
| Sito 1 | 3 | 3 | 0 | 3/68 (4,4%) |
| Sito 2 | 1 | 0 | 1 | 1/80 (1,3%) |
| Sito 3 | 8 | 1 | 7 | 8/120 (6,7%) |
| Sito 4 | 1 | 1 | 0 | 1/48 (2,1%) |
| Sito 5 | 7 | 6 | 1 | 7/381 (1,8%) |
| **Totale** | **20** | **11/697 (1,6%)***** | **9/697 (1,3%)** | **20/697 (2,9%)** |

*** 1 campione rimasto non valido dopo ripetizione dell'analisi dal campione originale

**Tabella 4. Risultati per età del paziente**

| Età del paziente | Campioni Positivi | | | Campioni Negativi | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***illumi**gene* / coltura tossigenica | Sensibilità % | 95% CI | ***illumi**gene* / coltura tossigenica | Specificità % | 95% CI |
| ≥ 2 - 12 anni | 10/11 | 90,9% | 62,3 – 98,4% | 75/79 | 94,9% | 87,7 – 98,0% |
| > 12 to 21 anni | 5/5 | 100% | 56,6 – 100% | 53/56 | 94,6% | 85,4 – 98,2% |
| > 21 anni | 83/87 | 95,4% | 88,8 – 98,2% | 417/437 | 95,4% | 93,0 – 97,0% |
| Età non nota | 1/1 | 100% | 20,7 – 100% | 1/1 | 100% | 20,7 – 100% |

## SENSIBILITA' ANALITICA

La sensibilità analitica di questo test per *C. difficile* è stata determinata con 20 replicati per ciascun analita, e con una probabilità fissata (ad es. 95% dovo 19/20 replicati erano positivi) di ottenere risultati positivi ai seguenti livelli di analiti:

| Ceppo ID | Tossinotipo | Fenotipo | LoD/Test |
|---|---|---|---|
| VPI 10463 | 0 | A+/B+ | 4 CFU/test |
| 2007431 | III (NAP1) | A+/B+ | 32 CFU/test |
| CFI | VIII | A-/B+ | 64 CFU/test |
| 2006240 | V (NAP7) | A+/B+ | 32 CFU/test |
| BI8 | III | A+/B+ | 64 CFU/test |
| 2007858 | IX/XXIII | A+/B+ | 32 CFU/test |
| 8864 | X | A-/B+ | 64 CFU/test |

## REATTIVITÀ DEL TEST

Le seguenti colture di *C. difficile* provenienti da fonti diverse sono state analizzate e hanno prodotto risultati positive a 64 CFU/test con ***illumi**gene C. difficile*:
Tipo 0: Ceppi 10463, 2004111, 2004205, 2005070, 2005257, 2008029, 2008162, 2008341, 2008351, 2009066, 2009099, B1, G1, J7, K12, Y1; Tipo III: 2004052, 2004118, 2007431, BI17, BI8; Tipo V: 2005325, 2006240, 2008188, 2009018, 2009065, BK6; Tipo VIII: 43598, 2008016, CF1; Tipo X 8864; Tipo XII 2007435; Tipo IX/XXIII 2007858; Tipo Non noto 2009132, 2009155, 2009277.

## RIPRODUCIBILITÀ

Pannelli di 10 campioni codificati in cieco sono stati forniti a tre laboratori indipendenti per studi di precisione. I campioni sono stati suddivisi a caso entro ciascun pannello per mascherare l'identità dei campioni. I pannelli includevano campioni artificiali prodotti al limite di rilevazione del test (n = 3) e appena sotto il limite del bianco (cioè, campione alto negativo, n = 3). I pannelli inoltre includevano campioni non caratterizzati positivi (n = 2) e negativi (n = 2). L'analisi è stata eseguita da differenti operatori in ciascun sito lo stesso giorno (variabilità intra-saggio) per cinque giorni (variabilità inter-saggio). Tre lotti di ***illumi**gene C difficile* sono stati utilizzati in questo studio. I risultati sono presentati nella tabella seguente:

| | Sito 1 | | Sito 2 | | Sito 3 | | Totale | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tipo di Campione | Percentuale di concordanza | | Percentuale di concordanza | | Percentuale di concordanza | | Percentuale di concordanza | |
| Negativo | 20/20 | 100% | 20/20 | 100% | 19/19**** | 100% | 59/59 | 100% |
| Alto Negativo | 25/30 | 83% | 29/30 | 97% | 28/30 | 93% | 82/90 | 91% |
| Basso Positivo | 30/30 | 100% | 30/30 | 100% | 30/30 | 100% | 90/90 | 100% |
| Positivo | 20/20 | 100% | 20/20 | 100% | 20/20 | 100% | 60/60 | 100% |

**** 1 campione ha generato un risultato del test non valido per errore dello strumento

**STUDI SULLA CROSS-REATTIVITÀ**

Studi sulla cross-reattività sono stati eseguiti utilizzando campioni fecali positivi e negativi inoculati con batteri o funghi con una concentrazione finale di 1,2 x $10^8$ o virus a un minimo di 1 x $10^{5,06}$ $TCID_{50}$/mL. Nessuno dei seguenti organismi inoculati nei campioni fecali ha interferito con ***illumi**gene C. difficile*:

*Aeromonas hydrophila, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Citrobacter freundii, Clostridium sordellii, Clostridium perfringens, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Escherichia coli O157:H7, Escherichia fergusonii, Escherichia hermannii, Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Lactococcus lactis, Listeria monocytogenes, Peptostreptococcus anaerobius, Plesiomonas shigelloides, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Salmonella* Groups B-E, *Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Shigella boydii, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica,* Adenovirus Types 40 e 41, Coxsackievirus, Echovirus, Rotavirus.

**ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI**

È stato osservato che le seguenti sostanze, se presenti nelle concentrazioni solvente/diluente saturato indicate, non interferiscono con i risultati del test alle concentrazioni finali indicate: Solfato di bario (5 mg/mL), grasso fecale (equivalente a 2,65 mg di acido stearico più 1,3 mg di acido palmitico per mL), emoglobina (come metaemoglobina) (3,2 mg/mL), IgA (5 mg/mL), Imodium AD® (0,00667 mg/mL), Kaopectate® (0,87 mg/mL), Metronidazole (12,5 mg/mL), mucina (3,33 mg/mL) Mylanta® (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (0,87 mg/mL), Prilosec® (0,5 mg/mL), Tagamet® (0,5 mg/mL), TUMS® (0,5 mg/mL), Vancomycin (12,5 mg/mL), globuli bianchi (5% V/V), sangue intero (5% V/V).

## FRANÇAIS

# illumigene™ C. difficile

## Test d'amplification de l'ADN pour la détection de *C. difficile* toxinogène dans les échantillons de selles

REF **280050** IVD **Dispositif médical de diagnostic in vitro**

**BUT DE LA METHODE**

Le test d'amplification ADN ***illumi**gene C. difficile*, obtenu à l'aide de l'***illumi**pro-10* est un test de diagnostic in vitro qualitatif pour la détection en direct de *Clostridium difficile* toxinogène dans les selles humaines de patientes pour lesquels une maladie associée au *Clostridium difficile* est suspectée.

Le test ***illumi**gene C. difficile* utilise la technique dite LAMP (loop-mediated isothermal DNA amplification ou amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle)[1,2] pour détecter le locus contrôlant la pathogénicité (PaLoc)[3] de *Clostridium difficile* toxinogène. Le locus PaLoc de *Clostridium difficile* est un segment de gène présent dans toutes les souches toxinogènes connues de *C. difficile*. Le locus PaLoc de *C. difficile* comprend à la fois le gène de la toxine A (tcdA) et celui de la toxine B (tcdB). Il contient des régions conservées aux extrémités, et se trouve au même site du génome de *C. difficile* dans toutes les souches toxinogènes.[3] Le test ***illumi**gene C. difficile* détecte le locus PaLoc en ciblant un fragment d'ADN faisant partie du gène de la toxine A. La région cible de tcdA choisie est une région restant intacte pour tous les toxinotypes A+B+ ou A-B+ connus.

Le test ***illumi**gene C. difficile* est conçu pour être utilisé dans les hôpitaux, les centres de référence ou les laboratoires médicaux. Le produit n'est pas destiné aux points-santé.

**RESUME ET EXPLICATION DU TEST**

Le test d'amplification de l'ADN ***illumi**gene C. difficile* est fondé sur la technique dite LAMP, qui utilise des amorces spécifiques du locus de pathogénicité PaLoc pour permettre l'amplification isotherme spécifique et continue de l'ADN. Un produit secondaire formé lors de cette amplification, le pyrophosphate de magnésium, forme un précipité blanc entraînant la turbidité de la solution de réaction. La présence de turbidité indique une réaction positive, alors que son absence représente une réaction négative. Le test ***illumi**gene C. difficile* inclut des amorces qui amplifient spécifiquement une région de 204 pb (pb pour paire de bases) parmi la séquence conservée en 5' du gène *tcdA* dans le locus PaLoc de *C. difficile* toxinogène, à partir d'échantillons de selle de patients que l'on soupçonne atteints de diarrhée associée à la présence de cet organisme. Les résultats de ce test sont mesurés à l'aide de l'incubateur / lecteur ***illumi**pro-10* de Meridian.

**PRINCIPE DU TEST**

Le *Clostridium difficile* toxinogène est une des causes principales de diarrhée et de colite; il constitue l'agent causal de virtuellement tous les cas de colite pseudomembraneuse. Bien qu'environ 2 % des adultes sains soient colonisés par *C. difficile*, la plupart des patients acquièrent cet organisme en tant qu'infection nosocomiale. Il est généralement admis que l'exposition à la plupart des antibiotiques permet la prolifération de *C. difficile* toxinogène en perturbant la flore intestinale normale. Les facteurs de virulence principaux de *C. difficile* sont vraisemblablement deux toxines de grande taille, TcdA (ou toxine A) et TcdB (ou toxine B). Ces toxines sont codées par deux gènes différents, appelés *tcdA* et *tcdB*. En association avec trois autres gènes, elles forment un locus de pathogénicité de 19,6 kb appelé PaLoc.

**MATERIEL FOURNI**

***Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boite.***

1. **Système Préparation de l'Echantillon (SPEC) *illumi**gene C. difficile*:** unité d'échantillonnage consistant en un compartiment de préparation de l'échantillon, un embout compte-gouttes, un capuchon et du tampon de dilution de l'échantillon (tampon phosphate salin et *Staphylococcus aureus* traité à la formaline, avec azoture de sodium (0,09 %) comme conservateur)
2. **Tampon de réaction *illumigene*:** tampon Tris contenant de l'azoture de sodium (0,09 %) comme conservateur
3. **Dispositif de test *illumi**gene C. difficile*:** deux compartiments séparés contenant des billes de réactifs lyophilisées comportant l'ADN polymérase, des désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs), et soit des amorces spécifiques de *C. difficile* (compartiment de TEST), soit des amorces pour *S. aureus* (compartiment de CONTROLE)
4. **Brosses d'échantillonnage**
5. **Tubes d'extraction *illumi**gene***

**MATERIEL FOURNI SEPAREMENT**

Trousse de Réactifs de contrôle externe ***illumi**gene*, référence: 279920

**MATERIEL NON FOURNI**

1. Gants en latex jetables, non poudrés
2. Embouts de pipettes sans désoxyribonucléase/ribonucléase, résistant aux aérosols
3. Contrôle d'extraction, tel un échantillon de selle positif ou un échantillon de selle négatif inoculé avec une souche *C difficile* toxinogène

**EQUIPEMENT NON FOURNI**

1. Bloc chauffant pour microtubes de 12 mm pouvant atteindre 95 C
2. Mélangeur vortex
3. Minuterie
4. Micropipette pouvant distribuer 50 µL
5. Micropipette pouvant distribuer 200 µL
6. ***illumi**pro-10*

**PRECAUTIONS D'EMPLOI**

1. Tous les réactifs sont pour usage in vitro uniquement.
2. Suivre les règles de biosécurité de niveau 2 et les bonnes pratiques de laboratoire lors des tests.[4] Traiter tous les échantillons et dispositifs de test usagés comme infectieux. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones où les échantillons ou les réactifs sont manipulés.
3. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons et se laver les mains soigneusement après la procédure.
4. Des programmes de contrôle de la qualité à l'usage des laboratoires de diagnostic moléculaire doivent être utilisés.[5]
5. La solution de dilution de l'échantillon ***illumi**gene* contient des organismes inactivés à la formaline, et qui doivent toutefois être manipulés comme étant potentiellement infectieux.
6. Le dispositif de test ***illumi**gene C. difficile* contient des réactifs lyophilisés. La pochette de protection ne doit être ouverte que juste avant d'effectuer le test.
7. Le dispositif de test ***illumi**gene C. difficile* comprend un mécanisme de verrouillage conçu pour empêcher la contamination de la zone de test avec le produit de l'amplification. NE PAS utiliser le dispositif si son mécanisme de verrouillage est endommagé.
8. Eliminer les dispositifs de test ***illumi**gene* immédiatement après leur utilisation, en s'assurant de bien laisser le verrou en place. Si le dispositif était ouvert après la procédure, la zone de test pourrait être contaminée avec le produit de l'amplification.

**DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE**

La date de péremption de la trousse est indiquée sur l'étiquette de celle-ci. Conserver la trousse entre 2 et 27 C.

**PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS**

**Type d'échantillon:** selle non formée (= qui prend la forme du récipient) de patient suspecté de maladie associée au *C. difficile* (CDAD).

**Echantillons de selle humaine, sans conservateur:** les échantillons de selle doivent être transportés et conservés à 2-8 C avant de procéder au test. Les échantillons doivent être testés dès que possible, mais peuvent être conservés jusqu'à 24H à 21-27 C ou 5 jours à 2-8 C. Les échantillons qui ne seront pas testés dans ces laps de temps doivent être congelés immédiatement après réception et conservés à ≤ 20 C jusqu'au moment du test. Les échantillons peuvent être congelés et décongelés une seule fois.

**Echantillons de selles humaines, conservés dans un milieu de Cary-Blair:** les échantillons doivent être transportés et conservés entre 2 et 8 C avant d'effectuer le test. Les échantillons doivent être testés dès que possible, mais peuvent être conservés jusqu'à 5 jours entre 2 et 8 C. Les échantillons qui ne seront pas testés dans ce délai doivent être congelés immédiatement après réception et stockés à ≤ -20 C jusqu'au moment d'effectuer le test. Les échantillons peuvent être congelés et décongelés une seule fois.

**PREPARATION DES REACTIFS**

S'assurer que les réactifs de la trousse sont bien à température ambiante (21 à 27 C) avant de les utiliser. En case de non respect, des résultats incorrects peuvent être observés.

**PREPARATION DES ECHANTILLONS**

*REMARQUE:* s'assurer que l'appareil ***illumi**pro-10* est allumé et que les vérifications de performance requises sont terminées avant d'initier la PREPARATION DES ECHANTILLONS. Se rapporter au manuel d'utilisation de l'***illumi**pro-10* pour plus d'informations au sujet de la mise en place et l'opération de l'appareil.

1. Bien mélanger l'échantillon de selle.
2. Utiliser la brosse d'échantillonnage pour prélever le spécimen mélangé.
   a. Selle liquide: immerger complètement la brosse d'échantillonnage dans le spécimen.
   b. Selle semi-solide: imprimer un mouvement de rotation à la brosse d'échantillonnage sur la surface du spécimen afin de couvrir légèrement la surface des poils de brosse. Environ la moitié de la brosse doit être recouverte; une quantité excessive de selle peut entraîner le colmatage du dispositif de collecte de l'échantillon.
3. Insérer la brosse d'échantillonnage dans le Système de préparation de l'Echantillon ***illumi**gene C. difficile* contenant le diluant et fermer le capuchon. Pour les selles conservées dans un milieu de type Cary-Blair, transférer 200 µL d'échantillon dans le Système de préparation de l'Echantillon ***illumi**gene C. difficile* et fermer le capuchon. Mélanger le Système de Préparation de l'Echantillon au vortex pendant au moins 10 secondes. Le spécimen dans le Système de Préparation de l'Echantillon peut être conservé avant extraction jusqu'à 24H à 2-27 C avant de procéder au test.
4. Retirer le capuchon de l'embout du Système de Préparation de l'Echantillon et presser sur celui-ci pour dispenser entre cinq et dix gouttes d'échantillon dans un tube d'extraction ***illumi**gene*.
6. Chauffer les tubes d'extraction ***illumi**gene* (contenant les échantillons mélangés) dans un bloc chauffant à 95 C pendant 10 +/- 2 minutes.
7. Retirer les tubes du bloc chauffant et mélanger au vortex pendant au moins 10 secondes. Les échantillons extraits peuvent être conservés pendant 4H à 2-8 C OU peuvent être congelés et conservés à ≤ 20 C pendant 1 jour avant de l'ajouter au tampon de réaction. Les échantillons extraits peuvent être congelés et décongelés une seule fois.

**PROCEDURE DE TEST**

***Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales, régionales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.***

*REMARQUE:* 10 échantillons au maximum peuvent être analysés au cours d'une seule exécution de l'***illumi**pro-10*.

1. Transférer 50 µL de l'échantillon extrait dans un tube de tampon de réaction ***illumi**gene* marqué de façon appropriée.
2. Mélanger le tube de tampon de réaction contenant l'échantillon extrait au vortex pendant 10 secondes environ.
3. Répéter les étapes 1 et 2 pour tous les échantillons à analyser avant de continuer.
4. Retirer un dispositif de test ***illumi**gene C. difficile* de sa pochette de protection pour chaque échantillon. Ouvrir le dispositif avec précaution, en tenant les tubes de manière à ne pas laisser tomber les réactifs lyophilisés au moment de l'ouverture. Placer le dispositif sur une surface plane ou un portoir approprié.
5. En utilisant un nouvel embout de pipette, transférer 50 µL d'échantillon du tube de tampon de réaction vers le compartiment de TEST (bille blanche) du dispositif de test ***illumi**gene*. Faire attention à ne pas introduire de bulles d'air. En utilisant **un nouvel embout de pipette**, transférer 50 µL d'échantillon du tube de tampon de réaction vers le compartiment de CONTROLE (bille jaune) du dispositif de test ***illumi**gene*. Faire attention à ne pas introduire de bulles d'air. Fermer le dispositif de test ***illumi**gene* et bien engager le mécanisme de verrouillage.
6. Tapoter le dispositif sur la paillasse pour mélanger et pour éliminer les bulles d'air. Examiner avec attention les tubes de réaction afin de s'assurer qu'il ne reste aucune bulle d'air dans le tube.
7. Insérer le dispositif de test ***illumi**gene* dans l'***illumi**pro-10* et commencer la réaction d'amplification et de détection. Les résultats s'afficheront à la fin du test.

**INTERPRETATION DES RESULTATS**

| Identification de l'échantillon | Résultat reporté | Interprétation |
|---|---|---|
| Echantillon de Patient | POSITIF | L'échantillon contient une souche *C. difficile* toxinogène présentant le locus de pathogénicité (PaLoc) |
| | NEGATIF | Aucun *C. difficile* non toxinogène détecté. |
| | NON VALIDE | **Aucun rendu de résultat. Répéter le test à partir de l'échantillon de selle original.** Echantillon inhibiteur, préparation de l'échantillon incorrecte, erreur de l'incubateur/lecteur, échec du contrôle interne. |
| Contrôle de l'extraction | POSITIF | Contrôle d'extraction valide. Les extractions ont été effectuées correctement. |
| | NEGATIF | **Echec de l'extraction. Ne pas rendre le résultat de test. Répéter le processus d'extraction pour tous les échantillons de selle.** |
| | NON VALIDE | **Aucun rendu de résultat. Ne pas rendre le résultat de test. Répéter le processus d'extraction pour tous les échantillons de selle.** Echantillon inhibiteur, préparation de l'échantillon incorrecte, réactif non opérant, erreur de l'incubateur/lecteur ou échec du contrôle interne. |
| Contrôle Positif | POSITIF | Résultat de Contrôle Positif valide. Les réactifs sont actifs au moment de leur utilisation, l'***illumi**pro-10* fonctionne correctement. |
| | NEGATIF | **Résultat de Contrôle incorrect.** Répéter le test de contrôle comme première étape pour déterminer la cause de l'échec. En cas d'échec répété, contacter les services techniques de Meridian ou votre distributeur local. |
| | NON VALIDE | **Aucun rendu de résultat. Répéter l'entièreté du test en utilisant les selles originales.** Préparation de l'échantillon incorrecte, réactif non opérant, erreur de l'incubateur/lecteur ou échec du contrôle interne. |
| Contrôle Négatif | POSITIF | **Résultat de Contrôle incorrect.** Répéter le test de contrôle comme première étape pour déterminer la cause de l'échec. En cas d'échec répété, contacter les services techniques de Meridian ou votre distributeur local. |
| | NEGATIF | Résultat de Contrôle Négatif valide. Les réactifs sont actifs au moment de leur utilisation, l'***illumi**pro-10* fonctionne correctement. |
| | NON VALIDE | **Aucun rendu de résultat. Répéter l'entièreté du test en utilisant les selles originales.** Préparation de l'échantillon incorrecte, réactif non opérant, erreur de l'incubateur/lecteur ou échec du contrôle interne. |
| PUITS VIDE | Aucun | Aucun dispositif de test dans le puits ***illumi**pro-10.* **OU** Il n'y a pas de résultat pour le dispositif de test ***illumi**gene* présent à cause d'une erreur de préparation de l'échantillon, d'un dispositif sale ou mal installé. **Répéter le test en utilisant les selles originales.** |

**CONTROLE DE QUALITE**

1. Chaque dispositif contient un puits de contrôle interne qui permet de déceler un problème d'inhibition de l'amplification, d'efficacité des réactifs du test ou de traitement des échantillons.
2. Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'utilisation de réactifs de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives locales, régionales et/ou nationales relatives à l'exécution des contrôles externes de qualité. .
3. Les réactifs de contrôle externe ***illumi**gene C. difficile* peuvent être obtenus séparément (Référence du catalogue 279920). Il est recommandé que la réactivité de chaque nouveau lot et chaque nouvelle livraison de trousse ***illumi**gene C. difficile* soient vérifiées à la réception et avant usage. Les tests de contrôle externe doivent être effectués en fonction des exigences locales, fédérales et/ou nationales. La trousse ***illumi**gene C. difficile* ne devrait pas être utilisée pour les tests d'échantillons de patient lorsque les contrôles ne produisent les résultats escomptés.
4. Un dispositif différent doit être utilisé pour chaque contrôle externe testé.
5. NE PAS extraire les contrôles positif ou négatif.
6. Un Contrôle d'Extraction, tel un échantillon de selle positif ou un échantillon de selle négatif inoculé avec une souche *C. difficile* toxinogène, doit être inclus dans chaque série d'extraction. Le Contrôle d'Extraction doit être traité comme un échantillon.

**VALEURS ATTENDUES**

La fréquence des diarrhées associées aux antibiotiques et provoquées par *C. difficile* dépend de différents facteurs, comme la population de patients, le type d'institution, et l'épidémiologie. L'incidence reportée des infections associées à *C. difficile* chez les patients chez qui on soupçonne une infection associée aux antibiotiques est de 15-20 % bien que des laboratoires différents puissent obtenir des taux de positivité supérieurs ou inférieurs.[6] Pendant la période de cette étude en 2010, une incidence de 15,5 % a été observée.

## LIMITES DU TEST

1. Le test ne fait pas la distinction entre les organismes viables et non viables.
2. Les résultats du test doivent être utilisés en association avec les informations disponibles d'évaluation clinique du patient et des autres procédures de diagnostic.
3. Ce test est uniquement destiné à être utilisé sur des selles non formées (qui prennent la forme du récipient) conservées ou sans conservateur. Les performances du test sur d'autres types d'échantillons n'ont pas été établies.
4. Les performances du test sur des échantillons de patients âgés de moins de deux ans n'ont pas été établies.
5. Deux groupes distincts, porteurs asymptomatiques de *C. difficile* à taux élevés, ont pu être identifiés. Des colonisations à des taux de 50 % ou plus ont été observés chez les enfants ainsi que des taux jusqu'à 32 % chez des patients atteints de fibrose kystique.[7,8]
6. Ce test ne précise pas la susceptibilité aux antibiotiques.
7. Ce test détecte mais ne distingue pas la souche NAP1 (Ribotype 027) des autres souches *C. difficile* toxinogènes.
8. La détection des acides nucléiques de la bactérie dépend du prélèvement, de la manipulation (y compris le transport et la conservation) et de la préparation (dilution et extraction). Des résultats incorrects peuvent être observés en cas de non respect des instructions de prélèvement, de manipulation et/ou de préparation.

## PERFORMANCES DU TEST

La trousse ***illumi**gene C. difficile* a été évaluée en 2010 par quatre laboratoires cliniques indépendants situés dans les régions du Midwest et du Sud des Etats-Unis ainsi que chez le producteur. Les performances globales sont présentées en table 1.

**Table 1. Performances globales**

| Culture cytotoxique | ***illumi**gene C. difficile* | | |
|---|---|---|---|
| | **Positif** | **Négatif** | **Total** |
| **Positif** | 99 | 5** | 104 |
| **Négatif** | 27* | 546 | 573 |
| **Total** | 126 | 551 | 677 |
| | | | **95 % CI** |
| **Sensibilité** | 99/104 | **95,2 %** | 89,2 – 97,9 % |
| **Spécificité** | 546/573 | **95,3 %** | 93,2 – 96,7 % |
| **Corrélation** | 645/677 | **95,3 %** | 93,4 – 96,6 % |

* 15/27 des résultats faussement positifs ont été observés positifs avec un autre test moléculaire approuvé par la FDA (Food and Drug Administration). Des 12 résultats faussement positifs restants, 8 ont été observés positifs avec un test GDH approuvé par la FDA.
** 2/5 résultats faussement négatifs ont été observés négatifs avec un autre test moléculaire approuvé par la FDA.

Un total de 697 échantillons de patients qualifiés a été évalué. Les échantillons ont été prélevés sur 274 (39,3 %) hommes et 419 (60,1 %) femmes. Dans le cas de 4 (0,6 %) des patients, le sexe n'est pas connu. Les groupes d'âge des patients varie de 2 ans à 96 ans. Aucune différence dans les performances des tests n'a été observée en fonction de l'âge du patient ou de sexe. Les tables 2 et 4 montrent la performance du test par site et selon l'âge des patients; la table 3 résume les renseignements sur le taux de résultats non valides par site.

**Table 2. Performances par site**

| Site | Echantillons Positifs | | | Echantillons Négatifs | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***illumi**gene* / Culture cytotoxique | Sensibilité % | 95 % IC | ***illumi**gene* / Culture cytotoxique | Spécificité % | 95 % IC |
| **Total** | **99/104**** | **95,2 %** | **89,2 – 97,9 %** | **546/573*** | **95,3 %** | **93,2 – 96,7 %** |
| Site 1 | 4/5 | 80,0 % | 37,6 – 96,4 % | 58/60 | 97,6 % | 88,6 – 99,1 % |
| Site 2 | 12/12 | 100 % | 75,7 – 100 % | 62/67 | 92,5 % | 83,7 – 96,8 % |
| Site 3 | 20/20 | 100 % | 83,9 – 100 % | 87/92 | 94,6 % | 87,9 – 97,7 % |
| Site 4 | 8/8 | 100 % | 67,6 – 100 % | 36/39 | 92,3 % | 79,7 – 97,3 % |
| Site 5 | 55/59 | 93,2 % | 83,8 – 97,3 % | 303/315 | 96,2 % | 93,5 – 97,8 % |

**Table 3. Taux de résultats non valides par site**

| Site | Evaluation du Site Clinique | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Total non valides | Tests non valides | Echec de l'instrument | Taux de non valides |
| Site 1 | 3 | 3 | 0 | 3/68 (4,4 %) |
| Site 2 | 1 | 0 | 1 | 1/80 (1,3 %) |
| Site 3 | 8 | 1 | 7 | 8/120 (6,7 %) |
| Site 4 | 1 | 1 | 0 | 1/48 (2,1 %) |
| Site 5 | 7 | 6 | 1 | 7/381 (1,8 %) |
| **Total** | **20** | **11/697 (1,6 %)***** | **9/697 (1,3 %)** | **20/697 (2,9 %)** |

*** 1 seul échantillon est observé non valide après répétition du test à partir de la selle originale.

**Table 4. Résultats selon l'âge du patient**

| Age du patient | Echantillons Positifs | | | Echantillons Négatifs | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***illumi**gene* / Culture toxigénique | Sensibilité % | 95 % IC | ***illumi**gene* / Culture toxigénique | Spécificité % | 95 % IC |
| ≥ 2 - 12 ans | 10/11 | 90,9 % | 62,3 – 98,4 % | 75/79 | 94,9 % | 87,7 – 98,0 % |
| > 12 to 21 ans | 5/5 | 100,% | 56,6 – 100 % | 53/56 | 94,6 % | 85,4 – 98,2 % |
| > 21 ans | 83/87 | 95,4 % | 88,8 – 98,2 % | 417/437 | 95,4 % | 93,0 – 97,0 % |
| Age inconnu | 1/1 | 100 % | 20.,7 – 100 % | 1/1 | 100 % | 20,7 – 100 % |

## SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique de ce test pour le *C. difficile* est basée sur 20 réplicats pour chaque mesurande avec une probabilité fixe (p. ex. 95 % ou 19/20 réplicats sont positifs) d'obtenir des réponses positives aux niveaux suivants de mesurande:

| Identification de la souche | Toxinotype | Phénotype | LdD/Test |
|---|---|---|---|
| VPI 10463 | 0 | A+/B+ | 4 CFU/test |
| 2007431 | III (NAP1) | A+/B+ | 32 CFU/test |
| CFI | VIII | A-/B+ | 64 CFU/test |
| 2006240 | V (NAP7) | A+/B+ | 32 CFU/test |
| BI8 | III | A+/B+ | 64 CFU/test |
| 2007858 | IX/XXIII | A+/B+ | 32 CFU/test |
| 8864 | X | A-/B+ | 64 CFU/test |

## REACTIVITE DU DOSSAGE

Les cultures de *C. difficile* suivantes provenant de différentes sources ont été testées et ont donné des réactions positives à 64 CFU/test avec le test ***illumi**gene C. difficile*:
Type 0: Souches 10463, 2004111, 2004205, 2005070, 2005257, 2008029, 2008162, 2008341, 2008351, 2009066, 2009099, B1, G1, J7, K12, Y1; Type III: 2004052, 2004118, 2007431, BI17, BI8; Type V: 2005325, 2006240, 2008188, 2009018, 2009065, BK6; Type VIII: 43598, 2008016, CF1; Type X 8864; Type XII 2007435; Type IX/XXIII 2007858; Type inconnu 2009132, 2009155, 2009277.

## REPRODUCTIBILITE DU TEST

Des panels de 10 échantillons, codés à l'aveugle, ont été fournis à trois laboratoires indépendants pour des études de précision. Les échantillons ont été triés de façon aléatoire pour chaque panel afin de masquer l'identité de l'échantillon. Les panels comprenaient des échantillons artificiels à la limite de détection du test (n = 3) et des échantillons justes en dessous de la limite de positivité (à savoir, échantillon négatif élevé, n = 3). Les panels comprenaient également des positifs (n = 2) et négatifs (n = 2) non caractérisés. Les tests ont été effectués par des opérateurs différents sur chaque site le même jour (variabilité intra-dosage), pendant cinq jours (variabilité inter-test). Trois lots de ***illumi**gene C difficile* ont été utilisés dans cette étude. Les résultats sont donnés dans la table ci-dessous:

| | Site 1 | | Site 2 | | Site 3 | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Type d'échantillon | Pourcentage de concordance | | Pourcentage de concordance | | Pourcentage de concordance | | Pourcentage de concordance | |
| Négatif | 20/20 | 100 % | 20/20 | 100 % | 19/19**** | 100 % | 59/59 | 100 % |
| Négatif élevé | 25/30 | 83 % | 29/30 | 97 % | 28/30 | 93 % | 82/90 | 91 % |
| Positif faible | 30/30 | 100 % | 30/30 | 100 % | 30/30 | 100 % | 90/90 | 100 % |
| Positif | 20/20 | 100 % | 20/20 | 100 % | 20/20 | 100 % | 60/60 | 100 % |

**** 1 seul échantillon a donné un résultat non valide avec l'instrument.

## REACTIONS CROISEES

Les réaction croisée ont été effectuées avec des échantillons de selles positifs et négatifs inoculés avec des organismes bactériens ou fongiques à une concentration finale de 1,2 x $10^8$ ou virale allant de 1 x $10^{5,06}$ $TCID_{50}$/mL. Aucun des organismes suivants, présents dans les selles, n'a réagi avec le test ***illumi**gene C. difficile*:
*Aeromonas hydrophila, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Citrobacter freundii, Clostridium sordellii, Clostridium perfringens, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Escherichia coli O157:H7, Escherichia fergusonii, Escherichia hermannii, Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Lactococcus lactis, Listeria monocytogenes, Peptostreptococcus anaerobius, Plesiomonas shigelloides, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Salmonella* Groups B-E, *Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Shigella boydii, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica,* Adenovirus Types 40 et 41, Coxsackievirus, Echovirus, Rotavirus.

## TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Les substances suivantes, présentes dans les selles humaines aux concentrations indiquées, n'ont provoqué aucune interférence sur les résultats du test: sulfate de baryum (5 mg/mL), graisses fécales (équivalentes à 2,65 mg d'acide stéarique plus 1,3 mg d'acide palmitique par mL), hémoglobine (en tant que méthémoglobine) (3,2 mg/mL), IgA (5 mg/mL), Imodium AD® (0,00667 mg/mL), Kaopectate® (0,87 mg/mL), Metronidazole (12,5 mg/mL), mucine (3,33 mg/mL) Mylanta® (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (0,87 mg/mL), Prilosec® (0,5 mg/mL), Tagamet® (0,5 mg/mL), TUMS® (0,5 mg/mL), Vancomycin (12,5 mg/mL), globules blancs (5% V/V), sang total (5% V/V).

**ESPAÑOL**

# *illumigene*™ *C. difficile*

## Prueba de amplificación de DNA para la detección de *C. difficile* citotoxigénico en muestras de materia fecal

REF 280050 IVD **Dispositivo médico para diagnóstico in vitro**

**USO INDICADO**
La prueba de amplificación de DNA ***illumi**gene C. difficile*, se lleva a cabo en el ***illumi**pro-10*, y es una prueba in vitro diagnostica cualitativa para la detección directa de *Clostridium dificile* toxigénico en muestras de heces humanas de pacientes que se sospechan tener diarrea asociada con *C. difficile* (CDAD en inglés).

La prueba ***illumi**gene C. difficile* utiliza la tecnología de amplificación de DNA isotérmica de lazo-mediado (LAMP)[1,2] para detectar el locus de patogenicidad (PaLoc)[3] de *Clostridium difficile* toxigénico. El PaLoc de *Clostridium difficile* es un segmento del gene que está presente en todas las cepas toxigénicas de *C. difficile*. El PaLoc de *C. difficile* codifica tanto el gen de la toxina A (*tcdA*) como el gen de la toxina B (*tcdB*), tiene regiones conservadas en sus extremos y se encuentra en el mismo sitio del genoma de *C. difficile* de todas las cepas toxigénicas.[3] La prueba ***illumi**gene C. difficile* detecta el PaLoc mediante el reconocimiento específico de un fragmento de DNA en el gen de la toxina A. La región blanco de *tcdA* que se seleccionó es una región que se conserva intacta en todas las cepas conocidas de toxinotipos A+B+ y A-B+.

El uso de la prueba ***illumi**gene C. difficile* es para hospitales, y laboratorios de tipo de referencia o estatales. El uso indicado de la prueba no es para punto de cuido.

**RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA**
La prueba de amplificación de DNA ***illumi**gene C. difficile* se basa en la tecnología de amplificación isotérmica de lazo-mediado que utiliza cebadores diseñados específicamente para el locus de patogenicidad PaLoc, con el objeto de proporcionar una amplificación isotérmica de DNA continua y específica. Un producto intermediario de esta amplificación es la formación de pirofosfato de magnesio, que forma un precipitado blanco que confiere turbidez a la solución de reacción. La presencia de turbidez significa que la reacción es positiva, mientras que la ausencia de turbidez significa que la reacción es negativa. La prueba ***illumi**gene C. difficile* contiene cebadores que amplifican específicamente una región de 204 pb en la secuencia conservada 5' del gen *tcdA,* dentro del PaLoc, en el *C. difficile* toxigénico, en muestras de materia fecal diarréica de pacientes que se sospecha que tienen diarrea asociada con *C. difficile* (CDAD en inglés). Los resultados de la prueba se determinan mediante el Incubador / Lector ***illumi**pro-10* de Meridian.

**PRINCIPIOS BIOLÓGICOS**
El *Clostridium difficile* toxigénico es una de las principales causas de diarrea y colitis asociadas con el uso de antibióticos, y es el agente etiológico de casi todos los casos de colitis seudomembranosa. A pesar de que aproximadamente un 2 % de los adultos sanos están colonizados con *C. difficile*, muchos pacientes contraen este microorganismo a través de una infección hospitalaria. Se cree que el tratamiento con la mayoría de los antibióticos permite la proliferación del *C. difficile* toxigénico porque alteran la flora intestinal normal. Se cree que dos proteínas grandes, TcdA (o toxina A) y TcdB (o toxina B), son los factores de virulencia principales producidos por *C. difficile.* Estas toxinas están codificadas en dos genes distintos que se denominan *tcdA* y *tcdB* respectivamente. Junto con tres genes más constituyen un locus de patogenicidad de 19,6 Kb llamado PaLoc.

**REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS**
***El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.***
1. **Ensamble para preparar las muestras de *illumi**gene C. difficile:* La unidad de muestreo consiste en una cámara para preparación de muestra, una punta con gotero, una tapa y el Tampón de Dilución de muestra (solución tamponada con fosfato y *Staphylococcus aureus* tratado con formol y azida de sodio (0,09%) como conservante)
2. **Tampón de Reacción de *illumi*gene:** Solución tamponada con Tris que contiene azida de sodio (0,09%)como conservante
3. **Dispositivo para la Prueba *illumi**gene C. difficile*:** Dos cámaras separadas que contienen liosferas de reactivo seco compuestas por DNA-polimerasa, desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) y ya sea cebadores específicos para *C. difficile* (cámara de TEST) o cebadores para *S. aureus* (cámara de CONTROL)
4. **Escobillas para recolección de muestras**
5. **Tubos para Extracción *illumi*gene**

**MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO**
Equipo de Control Externo ***illumi**gene*, número de catálogo: 279920

**MATERIALES NO PROPORCIONADOS**
1. Guantes de látex desechables sin talco
2. Puntas para micropipetas con protección contra aerosoles libres de DNAasa y RNAasa
3. Control de Extracción (muestras clínicas confirmadas como positivas o muestras negativas con *C. difficile* toxigénico añadido)

**EQUIPOS NO PROPORCIONADOS**
1. Baño seco con bloque calefactor de 12 mm capaz de alcanzar los 95 C
2. Agitador vorticial (Vórtex)
3. Cronómetro de intervalos.
4. Micropipeta capaz de dispensar 50 µL
5. Micropipeta capaz de dispensar 200 µL
6. ***illumi**pro-10*

**PRECAUCIONES**
1. Todos los reactivos son para uso diagnóstico in vitro solamente.
2. Siga las prácticas de Bioseguridad de Nivel 2 durante la ejecución de la prueba.[4] Trate todas las muestras y los Dispositivos de Prueba como agentes capases de transmitir infección. No coma ni beba ni fume en las áreas en las que se estén manejando muestras o reactivos del equipo.
3. Use guantes desechables mientras maneje las muestras y lávese las manos cuidadosamente al terminar.
4. Deben emplearse los Programas de Control de Calidad para laboratorios que hacen pruebas moleculares.[5]
5. El Tampón de Dilución de Muestra ***illumi**gene* contiene organismos inactivados con formalina y debe tratarse como si fuera potencialmente infeccioso.
6. El Dispositivo para la Prueba ***illumi**gene C. difficile* contiene reactivos liofilizados. La bolsa protectora no debe abrirse hasta que no esté todo listo para realizar la prueba.
7. El Dispositivo para la Prueba ***illumi**gene C. difficile* contiene un sistema de cierre diseñado para prevenir la contaminación del área de la prueba con el producto de amplificación. NO use Dispositivos para la Prueba con cierres dañados.
8. Inmediatamente después del procedimiento, deseche los Dispositivos para la Prueba ***illumi**gene*, y asegúrese de que la pestaña de cierre del dispositivo está en su sitio. La apertura del dispositivo después de la amplificación puede causar contaminación del área de prueba con producto de amplificación.

**VIDA ÚTIL Y ALMACENAMIENTO**
La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta de la caja. Almacene entre 2-27 C.

**RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**
**Tipo de Muestra:** Heces no-formadas indicativas de CDAD.

**Muestras de materia fecal humana sin conservar:** Las muestras deben ser transportadas y almacenarse a una temperatura de 2-8 C antes de analizarse. Las muestras deben analizarse tan pronto como sea posible, pero pueden mantenerse hasta 24 horas a 21-27 C o 5 días a 2-8 C. Las muestras que no van a ser analizadas antes de este tiempo deben congelarse tan pronto como se reciban y almacenarse a una temperatura ≤ -20 C hasta que vayan a ser analizadas. Las muestras pueden congelarse y descongelarse una vez.

**Muestras de materia fecal humana conservadas en medio de transporte Cary-Blair:** Las muestras deben ser transportadas y almacenadas a 2-8 C antes de analizarlas. Las muestras deben analizarse tan pronto como sea posible, pero pueden mantenerse hasta 5 días a 2-8 C. Las muestras que no van a ser analizadas antes de este tiempo deben congelarse tan pronto como se reciban y almacenarse a una temperatura ≤ -20 C hasta que vayan a ser analizadas. Las muestras pueden congelarse y descongelarse una vez .

**PREPARACIÓN DE REACTIVOS**
Asegúrese de que los reactivos hayan alcanzado la temperatura ambiente (21-27 C) antes de usarlos. Resultados incorrectos pueden resultar si los reactivos no alcanzan temperatura ambiente antes de ser usados.

**RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**
*NOTA:* Asegúrese de que el instrumento ***illumi**pro-10* esté encendido y de que las verificaciones de funcionamiento requeridas para el mismo se hayan completado antes de iniciar la PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Consulte el Manual del operador de ***illumi**pro-10* para obtener información adicional sobre cómo configurar y operar el instrumento.
1. Mezcle la muestra de materia fecal cuidadosamente.
2. Recoja la muestra mezclada mediante la Escobilla para recolección de muestra.
   a. Materia fecal líquida: Sumerja completamente en la muestra la Escobilla para recolección de muestra.
   b. Materia fecal sólida o semisólida: Rote la Escobilla para recolección de muestra sobre la superficie de la muestra, recubriendo ligeramente la superficie de las cerdas de la Escobilla. Debe cubrirse aproximadamente la mitad de la Escobilla; la recolección excesiva de materia fecal puede hacer que se obstruya el dispositivo para recolectar la muestra.
3. Coloque la Escobilla para Recolección de Muestra dentro del Ensamble para preparar la muestra que contiene el Tampón de Dilución de Muestra ***illumi**gene C. difficile* y cierre la tapa. Si la muestra está en medio de Cary-Blair, añada con una micropipeta 200 µL de muestra al Ensamble para preparar la muestra que contiene el Tampón de Dilución de Muestra ***illumi**gene C. difficile* y cierre la tapa. Agite la mezcla en un agitador vorticial (vórtex) por lo menos 10 segundos. Muestras en el Ensamble para preparar muestras ***illumi**gene C. difficile* pueden ser retenidas a 2-27 C hasta 24 horas antes del paso de extración.
4. Remueva la tapa de la punta con gotero del Ensamble y oprímalo para obtener entre cinco y diez gotas de muestra que se deben recoger en un Tubo limpio de Extracción ***illumi**gene*.
5. Repita los pasos de preparación de la muestra con todas las muestras que van a ser procesadas.
6. Caliente los Tubos de Extracción que contienen la muestra mezclada en un baño seco con el bloque calefactor a 95 C durante 10 ± 2 minutos.

7. Retire los tubos del baño seco y mézclelos en un agitador vorticial por 10 segundos. Una vez extraídas las muestras pueden ser retenidas a 2-8 C por 4 horas O pueden ser congeladas y almacenadas a ≤ -20 C por 1 día antes de ser añadidas al Tampón de Reacción. Muestras extraídas pueden ser congeladas y descongeladas una vez.

**PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA**

***Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.***

*NOTA:* Se pueden procesar un máximo de 10 muestras por cada ***illumi**pro-10*.

1. Transfiera 50 µL de la muestra extraída a un tubo con Tampón de Reacción de ***illumi**gene* adecuadamente marcado.
2. Mezcle en un agitador vorticial por 10 segundos el tubo con Tampón de Reacción que contiene la muestra extraída.
3. Repita los pasos 1 y 2 con todas las muestras que van a ser analizadas antes de proseguir.
4. Por cada muestra, saque un Dispositivo para la Prueba ***illumi**gene C. difficile* de la bolsa protectora en la que vienen. Abra cuidadosamente el dispositivo sujetando los tubos de tal manera que el reactivo liofilizado no se caiga al abrirlo. Coloque el dispositivo en una superficie plana o en una gradilla que pueda acomodarlo.
5. Usando una punta de pipeta nueva, transfiera 50 µL del tubo con Tampón de Reacción que contiene la muestra extraída a la cámara de TEST (perla blanca) del Dispositivo para la Prueba ***illumi**gene*. No introduzca burbujas. Usando una punta de pipeta nueva, transfiera 50 µL del tubo de Tampón de Reacción que contiene la muestra extraída a la cámara de CONTROL (perla amarilla) del Dispositivo para la Prueba ***illumi**gene*. No introduzca burbujas. Cierre el Dispositivo para la Prueba ***illumi**gene* y ajuste el cierre de modo que quede seguro.
6. Golpeé el dispositivo ligeramente sobre la mesa con el objeto de mezclar y eliminar las burbujas. Examine cuidadosamente los tubos de reacción para asegurarse que no quedan burbujas de aire.
7. Introduzca cada Dispositivo para la Prueba ***illumi**gene* dentro del ***illumi**pro-10* e inicie la reacción de amplificación y detección. Los resultados se mostrarán al concluir la prueba.

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

| ID de Muestra | Reporte de Resultados | Interpretación |
|---|---|---|
| Muestra de Paciente | POSITIVO | Muestra contiene *C. difficile* toxigénico el cual contiene el locus de patogenicidad (PaLoc) |
| | NEGATIVO | No se detecta *C. difficile* toxigénico . |
| | INVÁLIDO | **Resultado NO reportable. Repita la prueba usando la muestra original.** Muestra inhibitoria, preparación inadecuada de la muestra, falla de los reactivos, falla del instrumento o falla de los controles internos |
| Control de Extracción | POSITIVO | Control de Extracción Valido. Extracción ejecutada correctamente. |
| | NEGATIVO | **Falla en la Extracción. No reporte los resultados. Repita el paso de extracción para todas las muestras** |
| | INVÁLIDO | **Resultado NO reportable. No reporte el resultado. Repita el paso de extracción para todas las muestras** Muestra inhibitoria, preparación inadecuada de la muestra, falla de los reactivos, falla del instrumento o falla de los controles internos |
| Control Positivo | POSITIVO | Resultado de Control Positivo Valido. Reactivos activos al momento de uso, ***illumi**pro-10* funcionó correctamente. |
| | NEGATIVO | **Resultado de Control Incorrecto.** Repita la prueba de control como primer paso a determiner la causa de la falla. Si se repite la falla del Control, contacte el Servicio Técnico de Meridian al 1-800-343-3858 (US) o contacte su distribuidor local |
| | INVÁLIDO | **Resultado NO Reportable**. **Repita el procedimiento completo usando la muestra original**. Preparación inadecuada de la muestra, falla de los reactivos, falla del instrumento o falla de los controles internos |
| Control Negativo | POSITIVO | **Resultado de Control Incorrecto**. Repita la prueba de control como primer paso a determiner la causa de la falla. Si se repite la falla, contacte el Servicio Técnico de Meridian al 1-800-343-3858 (US) o contacte su distribuidor local |
| | NEGATIVO | Resultado de Control Negativo Valido. Reactivos activos al momento de uso, ***illumi**pro-10* funcionó correctamente |
| | INVÁLIDO | **Resultado NO Reportable**. **Repita el procedimiento completo usando la muestra original.** Muestra inhibitoria, preparación inadecuada de la muestra, falla de los reactivos, falla del instrumento o falla de los controles internos |
| POCILLO VACÍO | NINGUNO | No Dispositivo de Prueba ***illumi**gene* en el pocillo del ***illumi**pro-10*. **O** El Dispositivo de Prueba ***illumi**gene* presente es dudoso dado una falla en la preparación de la muestra, dispositivo sucio o introducido inapropiadamente. **Repita la prueba usando la muestra original** |

**CONTROL DE CALIDAD**

1. Cada dispositivo contiene un pocillo de control interno que controla la inhibición de la amplificación, los reactivos de la prueba y la eficacia del procesamiento de la muestra.
2. Una buena práctica de laboratorio recomienda el uso de sustancias de control. Los usuarios deben ceñirse a las pautas federales, estatales y locales apropiadas con respecto a cómo realizar controles de calidad externos.
3. Los Reactivos de Control Externo ***illlumi**gene C. difficile* se suplen por separado (Cat. # 279920). Se recomienda que la reactividad de cada lote nuevo y cada embarque nuevo de ***illumi**gene C. difficile* sea verificado al recibirse y antes de usar. Los Controles Externos deben ser realizados periódicamente de ahí en adelante. La prueba ***illumi**gene C. difficile* no debe ser usada para pruebas de pacientes si los controles externos no producen los resultados correctos.
4. Se debe usar un dispositivo separado por cada control externo.
5. NO Extraíga las muestras de Control Positivo o Negativo.
6. El Control de Extracción (muestras clínica confirmadas como positivas o muestras negativas con *C. difficile* toxigénico añadido) debe ser incluido cada vez que se corre la extracción. El Control de Extracción debe ser tratado como una muestra de paciente.

**VALORES ESPERADOS**

La frecuencia de la diarrea asociada a antibióticos causada por *C. difficile* depende de varios factores incluyendo la población de pacientes, el tipo de institución y la epidemiología. La incidencia que se reporta de enfermedad causada por *C. difficile* en pacientes con enfermedad asociada a antibióticos es de 15-20%, aunque diferentes facilidades pueden encontrar niveles de positividad fuera de esta gama.[6] La incidencia de *C. difficile* toxigénico durante éste studio en el 2010 fue de 15,5%.

**LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

1. La prueba no distingue entre organismos viables y organismos no viables.
2. Los resultados de la prueba deben usarse simultáneamente con la información disponible a partir de la evaluación clínica del paciente y de otros procedimientos diagnósticos.
3. Esta prueba es para uso de muestras de heces no-formadas, preservadas o sin preservar solamente. Características de ejecución de otro tipo de muestra clínica no han sido establecidas.
4. Las características de ejecución para muestras de pacientes de menos de dos años de edad no han sido establecidas.
5. Dos grupos distintos han sido identificados el cual pueden albergar *C. difficile* asintomáticamente en índices altos. Colonización a índices de 50% o más han sido reportado en infantes y en índices hasta 32% en pacientes de fibrosis quística.[7,8]
6. Este ensayo no identifica suseptibilidad antimicrobiana.
7. Este prueba detecta pero no diferencia la cepa NAP1 (Ribotipo 027) de otras cepas toxigénicas de *C. difficile*.
8. La detección del ácido nucleico bacteriano depende de la recolección apropiada de la muestra, el manejo (incluyendo transporte y almacenaje) y la preparación (dilución y extracción). El no seguir instrucciones para la recolección de muestra, manejo y preparación puede causar resultados incorrectos.

**CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO**

***illumi**gene C. difficile* fue evaluado en el 2010 en cuatro instituciones indendientes localizadas en las regions del Medio-Oeste y Sur de los Estados Unidos. La información a cerca de la ejecución se encuentra en la Tabla 1.

**Tabla 1. Data Comprensiva de Ejecución**

| Cultivo bacteriano Citotoxigénico | ***illumi**gene C. difficile* | | |
|---|---|---|---|
| | **Positivo** | **Negativo** | **Total** |
| **Positivo** | 99 | 5** | 104 |
| **Negativo** | 27* | 546 | 573 |
| **Total** | 126 | 551 | 677 |
| | | | **95% CI** |
| **Sensitividad** | 99/104 | **95,2%** | 89,2 – 97,9% |
| **Especificidad** | 546/573 | **95,3%** | 93,2 – 96,7% |
| **Correlación** | 645/677 | **95,3%** | 93,4 – 96,6% |

* 15/27 muestras falsas-positivas dieron resultados positivos por un ensayo molecular que ha sido autorizado por la FDA. De los 12 falsos-positivos restantes, 8 dieron resultados positivos por un ensayo para GDH (Antígeno Común) de *C. difficile* que ha sido autorizado por la FDA.
** 2/5 muestras falsas-negativas dieron resultados negativos por un ensayo molecular que ha sido autorizado por la FDA

Un total de 697 muestras de pacientes cualificadas fueron analizadas. Muestras fueron obtenidas de 274 hombres (39,3%) y 419 mujeres (60,1%). En 4 de las muestras (0,6%) el género fue desconocido. El grupo de las edades fue de 2 años de edad a 96 años de edad. No se observó diferencia en la ejecución de la prueba basado en el género de los pacientes. Las Tablas 2 y 4 demuestran la ejecución de la prueba por localidad del estudio clínico y edad de los pacientes. Tabla 3 resume el índice de muestras inválidas por localidad de estudio.

**Tabla 2. Características de Ejecución por Localidad**

| Lugar | Muestras Positivas | | | Muestras Negativas | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *illumigene* / Cultivo bacteriano Citotoxigénico | Sensitividad % | 95% CI | *illumigene* / Cultivo bacteriano Citotoxigénico | Especificidad % | 95% CI |
| Total | 99/104** | 95,2% | 89,2 – 97,9% | 546/573* | 95.3% | 93,2 – 96,7% |
| Lugar 1 | 4/5 | 80,0% | 37,6 – 96,4% | 58/60 | 97,6% | 88,6 – 99,1% |
| Lugar 2 | 12/12 | 100% | 75,7 – 100% | 62/67 | 92,5% | 83,7 – 96,8% |
| Lugar 3 | 20/20 | 100% | 83,9 – 100% | 87/92 | 94,6% | 87,9 – 97,7% |
| Lugar 4 | 8/8 | 100% | 67,6 – 100% | 36/39 | 92,3% | 79,7 – 97,3% |
| Lugar 5 | 55/59 | 93,2% | 83,8 – 97,3% | 303/315 | 96,2% | 93,5 – 97,8% |

**Tabla 3. Índice de inválidos por localidad**

| Lugar | Evaluación de las Localidades Clínicas | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Total de Inválidos | Inválidos por Ensayo | Inválidos por Instrumentos | Índice de Inválidos |
| Lugar 1 | 3 | 3 | 0 | 3/68 (4,4%) |
| Lugar 2 | 1 | 0 | 1 | 1/80 (1,3%) |
| Lugar 3 | 8 | 1 | 7 | 8/120 (6,7%) |
| Lugar 4 | 1 | 1 | 0 | 1/48 (2,1%) |
| Lugar 5 | 7 | 6 | 1 | 7/381 (1,8%) |
| **Total** | **20** | **11/697 (1,6%)*** ** | **9/697 (1,3%)** | **20/697 (2,9%)** |

*** 1 muestra permaneció inválida luego de repetir la prueba con la muestra original

**Tabla 4. Resultados por edad del paciente**

| Edad del Paciente | Muestras Positivas | | | Muestras Negativas | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *illumigene* / Cultivo bacteriano Citotoxigénico | Sensitividad % | 95% CI | *illumigene* / Cultivo bacteriano Citotoxigénico | Especificidad % | 95% CI |
| ≥ 2 - 12 años | 10/11 | 90,9% | 62,3 – 98,4% | 75/79 | 94,9% | 87,7 – 98,0% |
| > 12 a 21 años | 5/5 | 100% | 56,6 – 100% | 53/56 | 94,6% | 85,4 – 98,2% |
| > 21 años | 83/87 | 95,4% | 88,8 – 98,2% | 417/437 | 95,4% | 93,0 – 97,0% |
| Edad desconocida | 1/1 | 100% | 20,7 – 100% | 1/1 | 100% | 20,7 – 100% |

**SENSIBILIDAD ANALÍTICA**

La sensitividad analítica de este ensayo para *C. difficile* fue basado en 20 pruebas por cada mensurado y con una probabilidad declarada (ej. 95% donde 19/20 replicas son positivas) de obtener un resultado positivo en los siguientes niveles de mensurados:

| ID de Cepa | Toxinotipo | Fenotipo | LoD/Prueba |
|---|---|---|---|
| VPI 10463 | 0 | A+/B+ | 4 CFU/prueba |
| 2007431 | III (NAP1) | A+/B+ | 32 CFU/prueba |
| CFI | VIII | A-/B+ | 64 CFU/prueba |
| 2006240 | V (NAP7) | A+/B+ | 32 CFU/prueba |
| BI8 | III | A+/B+ | 64 CFU/prueba |
| 2007858 | IX/XXIII | A+/B+ | 32 CFU/prueba |
| 8864 | X | A-/B+ | 64 CFU/prueba |

**REACTIVAD DE LA PRUEBA**

Los siguientes cultivos de reserva obtenidos de diferentes fuentes fueron analizados y produjeron reacciones positivas a una concentración de 64 CFU/prueba con la Prueba ***illumi**gene C. difficile*:

Tipo 0: Cepas 10463, 2004111, 2004205, 2005070, 2005257, 2008029, 2008162, 2008341, 2008351, 2009066, 2009099, B1, G1, J7, K12, Y1; Tipo III: 2004052, 2004118, 2007431, BI17, BI8; Tipo V: 2005325, 2006240, 2008188, 2009018, 2009065, BK6; Tipo VIII: 43598, 2008016, CF1; Tipo X 8864; Tipo XII 2007435; Tipo IX/XXIII 2007858; Tipo desconocido 2009132, 2009155, 2009277.

**REPRODUCIBILIDAD**

Paneles de 10 muestras codificados a ciegas fueron suplidos a tres laboratorios independientes para estudios de precisión. Las muestras estaban mezcladas en diferente orden para poder ocultar su identidad. El panel incluía muestras artificiales manufacturadas al límite de detección de la prueba (n=3) y justo debajo del límite del blanco (ej. Muestras negativas-altas, n=3). El panel también incluía muestras sin caracterizar positivas (n=2) y negativas (n=2). El análisis fue ejecutado por diferentes operadores en cada localidad el mismo día (variabilidad intra-ensayo) por 5 días (variabilidad inter-ensayo). Tres lotes de ***illumi**gene C. difficile* fueron usado en este estudio. Los resultados se encuentran en la tabla siguiente:

| | Lugar 1 | | Lugar 2 | | Lugar 3 | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tipo de Muestra | Porcentaje de acuerdo | | Porcentaje de acuerdo | | Porcentaje de acuerdo | | Porcentaje de acuerdo | |
| Negativo | 20/20 | 100% | 20/20 | 100% | 19/19**** | 100% | 59/59 | 100% |
| Negativo-Alto | 25/30 | 83% | 29/30 | 97% | 28/30 | 93% | 82/90 | 91% |
| Positivo-Bajo | 30/30 | 100% | 30/30 | 100% | 30/30 | 100% | 90/90 | 100% |
| Positivo | 20/20 | 100% | 20/20 | 100% | 20/20 | 100% | 60/60 | 100% |

**** 1 muestra generó un resultado inválido por instrumento

**ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA**

Se realizaron estudios de reactividad cruzada con muestras positivas y negativas de materia fecal inoculada con organismos bacterianos o con hongos a una concentración final de 1,2 x $10^8$ o con virus a una concentración desde a un minimo de 1 x $10^{5,06}$ $TCID_{50}$/mL. Ninguno de los siguientes organismos presents en la materia fecal reaccionó con la prueba ***illumi**gene C. difficile*:

*Aeromonas hydrophila, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Citrobacter freundii, Clostridium sordellii, Clostridium perfringens, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Escherichia coli O157:H7, Escherichia fergusonii, Escherichia hermannii, Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Lactococcus lactis, Listeria monocytogenes, Peptostreptococcus anaerobius, Plesiomonas shigelloides, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Salmonella* Groups B-E, *Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Shigella boydii, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica,* Adenovirus Types 40 y 41, Coxsackievirus, Echovirus, Rotavirus.

**PRUEBAS PARA SUBSTANCIAS INTERFERENTES**

Las siguientes substancias, a las concentraciones especificadas de solvente/diluyente saturado no interfirieron con los resultados de la prueba a las concentraciones finales anotadas: Solfato de bario (5 mg/mL), grasa fecal (equivalente a 2,65 mg de ácido esteárico más 1,3 mg de ácido palmítico por mL), hemoglobina como metahemoglobina (3,2 mg/mL), IgA (5 mg/mL), Imodium AD® (0,00667 mg/mL), Kaopectate® (0,87 mg/mL), Metronidazole (12,5 mg/mL), mucina (3,33 mg/mL) Mylanta® (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (0,87 mg/mL), Prilosec® (0,5 mg/mL), Tagamet® (0,5 mg/mL), TUMS® (0,5 mg/mL), Vancomycin (12,5 mg/mL), glóbulos blancos (5% V/V), sangre total (5% V/V).

**DEUTSCH**

# illumigene™ *C. difficile*

## DNA-Amplifikationsassay zum Nachweis von toxigenen *C. difficile* Stämmen in Stuhlproben

REF 280050 IVD In-vitro-Diagnostikum

**VERWENDUNGSZWECK**

Der am ***illumi**pro-10* durchgeführte DNA-Amplifikationsassay ***illumi**gene C. difficile* ist ein qualitativer In-vitro-Diagnostiktest für den direkten Nachweis von toxigenen *C. difficile* in Human-Stuhlproben von Patienten, die vermutlich an einer mit *Clostridium difficile* assoziierten Erkrankung (*Clostridium difficile*-associated disease, kurz CDAD) leiden.

Der ***illumi**gene C. difficile*-Assay verwendet eine DNA-LAMP-Technik (Loop-mediated Isothermal Amplification)[1,2] um den Pathogenitätslokus (PaLoc)[3] der toxigenen *Clostridium difficile* Stämme nachzuweisen. Beim *Clostridium difficile*-PaLoc handelt es sich um ein Gensegment, das alle bekannte toxigene *C. difficile*-Stämme aufweisen. Der *C. difficile*-PaLoc-kodiert für das Toxin A-Gen (*tcdA*), sowie auch für das Toxin B-Gen (*tcdB*), umfasst konservierte Grenzregionen und tritt bei allen toxigenen Stämmen an derselben Stelle des *C. difficile*-Genoms auf.[3] Der ***illumi**gene C. difficile*-Assay weist den PaLoc nach, indem er auf ein partielles DNA-Fragment des Toxin A-Gens abzielt. Es wurde *tcdA* als Zielregion gewählt, die eine konservierte Region ist und sich in allen bekannten toxigenen *Clostridium difficile* Stämmen A+B+ und A-B+ befindet

***illumi**gene C. difficile* ist für den Einsatz in Krankenhauslabors, Referenzlabors oder staatlichen Laboratorien vorgesehen. Das Produkt ist nicht für den Einsatz am Behandlungsort vorgesehen.

**ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS**

Der ***illumi**gene C. difficile* DNA-Amplifikationsassay beruht auf der LAMP-Technik (Loop-mediated Isothermal Amplification), die speziell für den PaLoc-Pathogenitätslokus entwickelte Primer einsetzt, um für eine spezifische und kontinuierliche isotherme DNA-Amplifikation zu sorgen. Ein Nebenprodukt dieser Amplifikation ist Magnesiumpyrophosphat, dessen Bildung sich in Form einer weißen Ausfällung äußert und dadurch zu einer trüben Reaktionslösung führt. Das Vorliegen einer Trübung bedeutet eine positive Reaktion, während das Fehlen einer Trübung eine negative Reaktion bedeutet. Der ***illumi**gene C. difficile*-Assay enthält spezifische Primer für die Amplifikation einer 204-bp-Region der konservierten 5'-Sequenz des *tcdA*-Gens innerhalb des PaLoc des toxigenen *C. difficile* in diarrhöartigen Stuhlproben von Patienten, bei denen CDAD vermutet wird. Die Ergebnisse des Assays werden mit dem ***illumi**pro-10*-Inkubator/Leser von Meridian bestimmt.

**TESTPRINZIP**

Toxigene *Clostridium difficile* Stämme sind hauptsächliche Erreger von Antibiotika-assoziierter Diarrhö und Kolitis, und Erreger nahezu sämtlicher Fälle von pseudomembranöser Kolitis. Obwohl etwa 2 % der gesunden Erwachsenen mit *C. difficile*- kolonisiert sind, erwerben viele Patienten diesen Organismus durch eine nosokomiale Infektion. Es wird davon ausgegangen, dass die Wirkung der meisten Antibiotika eine Proliferation des toxigenen *C. difficile* durch Störung der normalen Darmflora ermöglicht. Von zwei großen Toxinproteinen (TcdA [oder Toxin A] und TcdB [Toxin B]) wird angenommen, dass sie die primären Virulenzfaktoren von *C. difficile* sind. Diese Toxine werden von zwei unterschiedlichen Genen codiert: *tcdA* bzw. *tcdB*. Zusammen mit drei weiteren Genen bilden sie einen 19,6-kb-Pathogenitätslokus mit dem Namen PaLoc.

**REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN**

***Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Aussenseite der Packung angegeben.***

1. ***illumi**gene C. difficile*-**Probenvorbereitungsapparat:** Probennahmeeinheit, bestehend aus Probenvorbereitungskammer, Tropferspitze, Verschlusskappe und Probenverdünnungspuffer (mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung und Formalin behandelter *Staphylococcus aureus*, mit Natriumazid (0,09 %) als Konservierungsmittel)
2. ***illumi**gene*-**Reaktionspuffer:** Tris-gepufferte Lösung mit Natriumazid (0,09 %) als Konservierungsmittel
3. ***illumi**gene C. difficile*-**Testgerät:** Zwei separate Kammern, die Trockenreagenz-Lyosphären aus DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) und entweder für *C. difficile* spezifischem Primer (TEST-Kammer) oder *S. aureus*-Primer (KONTROLL-Kammer) enthalten
4. **Probennahmebürstchen**
5. ***illumi**gene*-**Probenextraktionsröhrchen**

**SEPARAT BESTELLBARE MATERIALIEN**

***illumi**gene*-Kit zur externen Kontrolle, Bestell-Nr: 279920

**BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN**

1. Einmal-Handschuhe aus Latex, puderfrei
2. DNAse/RNAse-freie, aerosolresistente Pipettenspitzen
3. Extraktionskontrolle (bekannte positive klinische Probe oder eine negative Probe, die mit toxigenen *C. difficile* beimpft wurde)

**NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE GERÄTSCHAFTEN**

1. Trockenbad mit 12-mm-Heizblock (95 C-Kapazität)
2. Vortexmischer
3. Intervallzeitgeber
4. Mikropipette mit Abgabekapazität von 50 µL
5. Mikropipette mit Abgabekapazität von 200 µL
6. ***illumi**pro-10*

**VORSICHTSMASSNAHMEN**

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Befolgen Sie empfohlene Gesichtspunkten (Bio-Sicherheit Stufe 2) und gute Laborpraktiken (GLP) während des Tests.[4] Alle Proben und verbrauchte Testgeräte als POTENZIELLE BIOHAZARD-STOFFE behandeln. In Bereichen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien gehandhabt werden, darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
3. Bei der Handhabung von Proben stets Einmal-Handschuhe tragen und danach die Hände gründlich waschen.
4. Es sollten Qualitätssicherungsprogramme für Labors eingesetzt werden, die Molekulartests durchführen.[5]
5. Der ***illumi**gene*-Probenverdünner enthält mit Formalin inaktivierte Organismen, und sollte wie potentiell biogefährliches Material entsorgt werden .
6. Das ***illumi**gene C. difficile*-Testgerät enthält lyophilisierte Reagenzien. Der Schutzbeutel sollte erst unmittelbar vor der Durchführung des Assays geöffnet werden.
7. Das ***illumi**gene C. difficile*-Testgerät besitzt eine Verschlusslasche, die vor Kontaminierung des Testbereichs durch das Amplifikationsprodukt schützen soll. KEINE Testgeräte mit defekten Verschlusslaschen verwenden.
8. Gebrauchte ***illumi**gene*-Testgeräte unmittelbar nach der Verarbeitung entsorgen und die Verschlusslasche dabei fest geschlossen belassen. Falls das Gerät nach der Amplifikation geöffnet wird, könnte der Testbereich durch das Amplifikationsprodukt kontaminiert werden.

**HALTBARKEIT UND LAGERUNG**

Das Verfallsdatum ist auf dem Kit-Etikett angegeben. Das Kit bei 2–27 C lagern.

**PROBENNAHME UND –VORBEREITUNG**

**Probentyp:** ungeformte Proben die auf "Clostridium difficile assoziierte Diarrhoe" (CDAD) hindeuten

**Humane Stuhlproben, ohne Konservierungsmittel:** Die Proben müssen in luftdicht verschlossene Transportbehälter eingegeben werden und bis zum Testen bei 2-8 C gelagert werden. Die Proben sind so bald wie möglich zu testen, können jedoch bei 21-27 C bis zu 24 Stunden oder bei 2-8 C bis zu 5 Tagen aufbewahrt werden. Proben, die voraussichtlich nicht innerhalb dieses Zeitraums getestet werden, sind unmittelbar nach Eingang einzufrieren und bis zum Testen bei ≤ -20 C zu lagern. Die Proben können einmal eingefroren und aufgetaut werden.

**Humane Stuhlproben, in Cary-Blair-Medium konserviert:** Die Proben müssen in luftdicht verschlossene Transportbehälter eingegeben werden und bis zum Testen bei 2-8 C gelagert werden. Die Proben sind so bald wie möglich zu testen, können jedoch bei 2-8 C bis zu 5 Tagen aufbewahrt werden. Proben, die voraussichtlich nicht innerhalb dieses Zeitraums getestet werden, sind unmittelbar nach Eingang einzufrieren und bis zum Testen bei ≤ -20 C zu lagern. Die Proben können einmal eingefroren und aufgetaut werden.

**VORBEREITUNG DER REAGENZIEN**

Sicherstellen, dass die Kit-Reagenzien vor der Verwendung Zimmertemperatur (21-27 C) erreicht haben. Werden die Reagenzien vor dem Einsatz nicht auf Zimmertemperatur gebracht, kann dies zu inkorrekten Ergebnissen führen.

**PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG**

*HINWEIS:* Sicherstellen, dass das ***illumi**pro-10*-Gerät eingeschaltet ist und die erforderlichen Leistungsüberprüfungen vor dem Einleiten der PROBENVORBEREITUNG abgeschlossen wurden. Bezüglich weiterer Angaben zur Einrichtung und Bedienung des Geräts bitte das ***illumi**pro-10*-Benutzerhandbuch einsehen.

1. Stuhlprobe gründlich mischen.
2. Mit Hilfe des Probennahmebürstchens eine gemischte Probe entnehmen.
   a. Flüssiger Stuhl: Das Probennahmebürstchen vollständig in die Probe eintauchen.
   b. Halbfester Stuhl: Das Probennahmebürstchen über die Probenoberfläche drehen, sodass die Borsten leicht beschichtet werden. Etwa die halbe Bürste sollte beschichtet sein; eine zu große Probenmenge könnte das Probennahmegerät verstopfen.
3. Das Probennahmebürstchen in den ***illumi**gene C. difficile* Probenvorbereitungsapparat mit dem Probenverdünnungspuffer einbringen und die Verschlusskappe anbringen. Für Stuhlproben im Cary-Blair-Medium, 200 µL der Probe in den ***illumi**gene C. difficile* Probenvorbereitungsapparat einbringen und die Verschlusskappe anbringen Den Probenvorbereitungsapparat mindestens 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen. Proben im ***illumi**gene C. difficile* Probenvorbereitungsapparat können vor der Extraktion bei 2-27 C bis zu 24 Stunden aufbewahrt werden.
4. Die Spitzenkappe des Probenvorbereitungsapparats entfernen und fünf bis zehn Tropfen der Probe in ein sauberes ***illumi**gene*-Probenextraktionsröhrchen auspressen.
5. Die Probenvorbereitungsschritte für alle zu verarbeitenden Proben wiederholen.
6. Die Probenextraktionsröhrchen mit dem ***illumi**gene* Probengemisch 10 +/- 2 Minuten lang in einem Trockenbad/Heizblock bei 95 C erhitzen.
7. Die Röhrchen aus dem Trockenbad/Heizblock nehmen und etwa 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen. Die extrahierten Proben können jedoch bei 2-8 C bis zu 4 Stunden ODER bei ≤ -20 C 1 Tag vor Zugabe in das Reaktionspufferröhrchen aufbewahrt werden. Extrahierte Proben können einmal eingefroren und aufgetaut werden.

**TESTDURCHFÜHRUNG**

***Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.***

*HINWEIS:* Bei einem einzigen ***illumi**pro-10*-Lauf können maximal 10 Proben verarbeitet werden.

1. 50 µL extrahierte Probe in ein entsprechend gekennzeichnetes ***illumi**gene*-Reaktionspufferröhrchen transferieren.
2. Das Reaktionspufferröhrchen mit der extrahierten Probe ca. 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen.
3. Vor dem weiteren Vorgehen die Schritte 1 und 2 für alle zu analysierenden Proben durchführen.
4. Für jede Probe ein ***illumi**gene C. difficile*-Testgerät aus dem Schutzbeutel nehmen. Das Gerät sorgfältig öffnen und die Röhrchen so halten, dass das lyophilisierte Reagenz nach dem Öffnen nicht herausfällt. Das Gerät auf einer ebenen Fläche oder in einem Gestell platzieren.
5. Mit Hilfe einer neuen Pipettenspitze 50 µL des Reaktionspufferröhrchens mit extrahierter Probe in die TEST-Kammer (weiße Kugel) des ***illumi**gene*-Testgeräts transferieren. Keine Luftblasen einbringen. Mit Hilfe einer neuen Pipettenspitze 50 µL des Reaktionspufferröhrchens mit extrahierter Probe in die KONTROLL-Kammer (gelbe Kugel) des ***illumi**gene*-Geräts transferieren. Keine Luftblasen einbringen. Das ***illumi**gene*-Testgerät schließen und die Verschlusslasche gut fixieren.
6. Das ***illumi**gene C. difficile*-Testgerät auf der Arbeitsfläche klopfen, um den Inhalt zu mischen und Luftblasen zu entfernen. Sorgfältig überprüfen, dass keine Luftblasen in den ***illumi**gene*-Testgeräten übrig bleiben.
7. Das ***illumi**gene*-Testgerät in den ***illumi**pro-10* geben und die Amplifikationsreaktion und den Nachweis starten. Die Ergebnisse werden nach dem Abschluss des Laufs angezeigt.

## AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

| Proben ID | Angezeigte Ergebnisse | Interpretation |
|---|---|---|
| Patientenproben | POSITIV | Proben, die toxigene *C. difficile* Stämme mit dem Pathogenitätslokus (PaLoc) aufweisen. |
| | NEGATIV | Kein Nachweis von toxigenen *C. difficile* Stämmen. |
| | UNGÜLTIG | **Kein auswertbares Ergebnis. Den Test mit der ursprünglichen Stuhlprobe wiederholen.** Inhibitoren in der Patientenprobe, unsachgemäße Probenvorbereitung, Versagen des Reagenzes, Versagen des Instruments oder Versagen der internen Kontrolle |
| Extraktionskontrolle | POSITIV | Gültige Extraktionskontrolle.Einwandfreie Durchführung der Extraktionen. |
| | NEGATIV | **Versagen der Extraktion. Kein auswertbares Testergebnis. Den Extraktionsprozess für alle Proben wiederholen.** |
| | UNGÜLTIG | **Kein auswertbares Ergebnis. Das Testergebnis nicht anwenden. Den Extraktionsprozess für alle Proben wiederholen.** Inhibitoren in der Patientenprobe, unsachgemäße Probenvorbereitung, Versagen des Reagenzes, Versagen des Instruments oder Versagen der internen Kontrolle |
| Positive Kontrolle | POSITIV | Gültiges positives Kontrollergebnis. Die Reagenzien waren während der Testdurchführung aktiv, ***illumi**pro-10* ist einwandfrei gelaufen |
| | NEGATIV | **Unkorrektes Kontrollergebnis.** Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer. |
| | UNGÜLTIG | **Kein auswertbares Ergebnis. Den ganzen Test mit den ursprünglichen Stuhlproben wiederholen**. Unsachgemäße Probenvorbereitung, Versagen des Reagenzes, Versagen des Instruments oder Versagen der internen Kontrolle. |
| Negative Kontrolle | POSITIV | **Unkorrektes Kontrollergebnis.** Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer. |
| | NEGATIV | Gültiges negatives Kontrollergebnis. Die Reagenzien waren während der Testdurchführung aktiv, ***illumi**pro-10* ist einwandfrei gelaufen. |
| | UNGÜLTIG | **Kein auswertbares Ergebnis. Den ganzen Test mit den ursprünglichen Stuhlproben wiederholen**. Unsachgemäße Probenvorbereitung, Versagen des Reagenzes, Versagen des Instruments oder Versagen der internen Kontrolle |
| LEERE VORRICHTUNG | KEINE | Kein ***illumi**genes* Testgerät in der ***illumi**pro-10* Vorrichtung. **ODER** Das ***llumi**gene* vorhandene Testgerät ist wegen unsachgemäßer Probenvorbereitung, beschmutzten Testgerät oder wegen schlecht angepassten Testgeräts gefährdet **Den Test mit der ursprünglichen Stuhlprobe wiederholen**. |

## QUALITÄTSKONTROLLE

1. Jedes Gerät besitzt eine interne Kontrollvertiefung, die die Amplifikationsinhibition, Assayreagenzien und Effizienz der Probenverarbeitung kontrolliert.
2. Die Regeln der guten Laborpraxis empfehlen den Einsatz von Kontrollmaterialien. Benutzer sollten entsprechende bundesstaatliche, nationale und lokale Richtlinien bezüglich des Einsatzes externer Qualitätskontrollen.
3. Die ***illumi**gene C. difficile* externen Kontrollen sind separat erhältlich (Bestellnummer 279920). Die Reaktivität jeder neuen Kit-Chargennummer und jeder neuen Lieferung eines ***illumi**gene C. difficile Tests* sollte nach Erhalt und vor Verwendung geprüft werden. Allerdings, ist die Anzahl der zusätzlich durchzuführenden Tests mit externen Kontrollen abhängig von den örtlichen, staatlichen oder bundesstaatlichen Bestimmungen, sowie zulassungsbehördlichen Auflagen. Den ***illumi**gene C. difficile* Test-Kit nicht verwenden, wenn die Kontrolltests keine korrekten Ergebnisse erbringen.
4. Für jede Kontrolle muss ein separates Gerät verwendet werden.
5. Die externen positiven und negativen Kontrollen NICHT extrahieren.
6. Eine Extraktionskontrolle (bekannte positive klinische Probe oder eine negative Probe, die mit toxigenen *C. difficile* beimpft wurde) sollte in jedem Extraktionsdurchlauf eingeplant werden. Die Extraktionskontrolle sollte in der gleichen Weise wie eine Patientenprobe analysiert werden.

## ERWARTETE WERTE

Die Häufigkeit von antibiotika-assoziierter Diarrhoe durch *C. difficile* ist abhängig von verschiedenen Faktoren, einschließlich der Patientenpopulation, Art der Institution und Epidemiologie. Die berichtete Inzidenz von *C. difficile*-assoziierten Erkrankungen bei Patienten mit Verdacht einer antibiotika-assoziierten Erkrankung liegt bei 15-20 %, obwohl unterschiedliche Einrichtungen Positivraten finden können, die über oder unter diesem Bereich liegen.[6] Die Inzidenz von toxigenen *C. difficile* Stämmen während der 2010 Zeitstudie war 15,5 %.

## EINSCHRÄNKUNGEN

1. Der Assay unterscheidet nicht zwischen lebensfähigen und nicht lebensfähigen Organismen.
2. Die Testergebnisse sind in Verbindung mit den verfügbaren Daten aus der klinischen Untersuchung des Patienten und anderen Diagnostikverfahren heranzuziehen.
3. Der Test sollte nur mit ungeformtem Stuhl, konserviert oder nicht, getestet werden. Die Leistung mit anderen Arten von klinischen Proben wurde nicht evaluiert.
4. Die Leistung mit Proben von Patienten, junger als 2 Jahre, wurde nicht evaluiert.
5. Es wurden zwei deutliche Gruppen identifiziert, die sehr häufig asymptomatische Träger von *C. difficile* sind. Bei Säuglingen wurden Besiedlungsraten bis zu 50 % und mehr festgestellt und bei Patienten mit Mukoviszidose Raten bis zu 32 %.[7,8]
6. Dieser Test indentifiziert nicht den Verdacht auf Antibiotikas.
7. Dieser Test weist den NAP1 (Ribotyp 027) Stamm nach, aber kann ihn nicht von anderen toxigenen *C. difficile* Stämmen differenzieren.
8. Der Nachweis von bakterieller Nukleinsäure ist abhängig von einwandfreier Probenabnahme, Probengewinnung ( inkl. Transport und Lagerung) und Vorbereitung (Verdünnung und Extraktion). Fehler, die während der Probenabnahme, Probengewinnung und Vorbereitung Anweisungen auftreten, können zu ungültigen Ergebnissen führen.

## LEISTUNGSMERKMALE

Der ***illumi**gene C. difficile* Test wurde 2010 bei vier unabhängigen klinischen Labortestorten, die im Mittleren Westen und in südlichen Regionen der Vereinigten Staaten liegen, und beim Hersteller, evaluiert. Die Testergebnisse sind in der folgende Tabelle 1 aufgeführt

**Tabelle 1. Gesamte Leistungsmerkmalsdaten**

| "Zytotoxintest" auf Zellkulturen | ***illumi**gene C. difficile* | | |
|---|---|---|---|
| | **Positiv** | **Negativ** | **Gesamt** |
| **Positiv** | 99 | 5** | 104 |
| **Negativ** | 27* | 546 | 573 |
| **Gesamt** | 126 | 551 | 677 |
| | | | **95 % VI** |
| **Sensitivität** | 99/104 | **95,2 %** | 89,2 – 97,9 % |
| **Spezifität** | 546/573 | **95,3 %** | 93,2 – 96,7 % |
| **Übereinstimmung** | 645/677 | **95,3 %** | 93,4 – 96,6 % |

* 15 der 27 falsch positiven Ergebnissen waren positiv mit einem anderen FDA "cleared" molecular Test. Von den 12 restlichen falsch positiven Ergebnissen, waren 8 positiv mit einem FDA "cleared" GDH-Test.
** 2 der 5 falsch negativen Ergebnissen waren negativ mit einem anderen FDA "cleared" molecular Test.

Insgesamt wurden 697 qualifizierte Patientenproben analysiert. Proben stammten von 274 (39,3 %) Männern und 419 (60,1 %) Frauen. Bei 4 %(0,6 %)der Patienten war das Geschlecht nicht bekannt. Die Altersgruppen der Patienten, von denen die Proben stammten, reichten von zwei Jahren bis zu 96 Lebensjahren. Es zeigten sich keine auf Geschlecht oder Alter der Patienten zurückzuführenden Testleistungsunterschiede. In den folgenden Tabellen 2 und 4 ist die Assay-Leistung nach klinischem Standort und Patientenalter aufgeführt; Tabelle 3 fasst die Ungültigkeitsquote nach klinischem Standort zusammen.

**Tabelle 2. Leistungsmerkmale nach klinischem Standort**

| Ort | Positive Proben | | | Negative Proben | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***illumi**gene* / "Zytotoxintest" auf Zellkulturen | Sensitivität % | 95 % VI | ***illumi**gene* / "Zytotoxintest" auf Zellkulturen | Spezifität % | 95 % VI |
| **Gesamt** | **99/104**** | **95,2 %** | **89,2 – 97,9 %** | **546/573*** | **95,3 %** | **93,2 – 96,7 %** |
| Ort 1 | 4/5 | 80,0 % | 37,6 – 96,4 % | 58/60 | 97,6 % | 88,6 – 99,1 % |
| Ort 2 | 12/12 | 100 % | 75,7 – 100 % | 62/67 | 92,5 % | 83,7 – 96,8 % |
| Ort 3 | 20/20 | 100 % | 83,9 – 100 % | 87/92 | 94,6 % | 87,9 – 97,7% |
| Ort 4 | 8/8 | 100 % | 67,6 – 100 % | 36/39 | 92,3 % | 79,7 – 97,3 % |
| Ort 5 | 55/59 | 93,2 % | 83,8 – 97,3 % | 303/315 | 96,2 % | 93,5 – 97,8 % |

**Tabelle 3. Ungültigkeitsquote nach klinischem Standort**

| Ort | Klinische Ort Auswertung | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Gesamte ungültige Ergebnisse | Ungültige Test-ergebnisse | Ungültige Instrument-ergebnisse | Ungültigkeitsquote |
| Ort 1 | 3 | 3 | 0 | 3/68 (4,4 %) |
| Ort 2 | 1 | 0 | 1 | 1/80 (1,3 %) |
| Ort 3 | 8 | 1 | 7 | 8/120 (6,7 %) |
| Ort 4 | 1 | 1 | 0 | 1/48 (2,1 %) |
| Ort 5 | 7 | 6 | 1 | 7/381 (1,8 %) |
| **Gesamt** | **20** | **11/697 (1,6 %)***** | **9/697 (1,3 %)** | **20/697 (2,9 %)** |

*** Eine Probe blieb ungültig nach wiederholtem Test der Originalprobe.

**Tabelle 4. Leistungsmerkmale nach Patientenalter**

| Patientenalter | Positive Proben | | | Negative Proben | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***illumi**gene* / Toxigene Kultur | Sensitivität % | 95 % VI | ***illumi**gene* / Toxigene Kultur | Spezifität % | 95 % VI |
| ≥ 2 - 12 Jahren | 10/11 | 90,9 % | 62,3 – 98,4 % | 75/79 | 94,9 % | 87,7 – 98,0 % |
| > 12 bis 21 Jahren | 5/5 | 100 % | 56,6 – 100 % | 53/56 | 94,6 % | 85,4 – 98,2 % |
| > 21 Jahren | 83/87 | 95,4 % | 88,8 – 98,2 % | 417/437 | 95,4 % | 93,0 – 97,0 % |
| **Keine Angaben** | 1/1 | 100 % | 20,7 – 100 % | 1/1 | 100% | 20,7 – 100 % |

**TESTEMPFINDLICHKEIT**

Die Testempfindlichkeit dieses Assays für *C. difficile* stützt sich auf 20 Wiederholungstests für jedes Mass bei einer Wahrscheinlichkeitsangabe (z. B. 95 % mit 19/20 positiven Wiederholungstests) zur Erzielung positiver Reaktionen bei den folgenden Niveaus der Masseinheiten:

| Stamm ID | Toxinotyp | Phänotyp | LoD/Test |
|---|---|---|---|
| VPI 10463 | 0 | A+/B+ | 4 CFU/test |
| 2007431 | III (NAP1) | A+/B+ | 32 CFU/test |
| CFI | VIII | A-/B+ | 64 CFU/test |
| 2006240 | V (NAP7) | A+/B+ | 32 CFU/test |
| BI8 | III | A+/B+ | 64 CFU/test |
| 2007858 | IX/XXIII | A+/B+ | 32 CFU/test |
| 8864 | X | A-/B+ | 64 CFU/test |

**ASSAY-REAKTIVITÄT**

Die folgenden *C. difficile*-Bestandskulturen verschiedener Quellen ergaben beim Testen mit ***illumi**gene C. difficile* positive Reaktionen bei 64 CFU/test:

Typ 0: Stämme 10463, 2004111, 2004205, 2005070, 2005257, 2008029, 2008162, 2008341, 2008351, 2009066, 2009099, B1, G1, J7, K12, Y1; Typ III: 2004052, 2004118, 2007431, BI17, BI8; Typ V: 2005325, 2006240, 2008188, 2009018, 2009065, BK6; Typ VIII: 43598, 2008016, CF1; Typ X 8864; Typ XII 2007435; Typ IX/XXIII 2007858; Unbekannte Typs 2009132, 2009155, 2009277.

**REPRODUZIERBARKEIT**

Für die Durchführung von Präzisionsstudien wurden codierte Profile von 10 Proben an drei unabhängige Labors geliefert. Die Proben waren innerhalb der einzelnen Profile sortiert, um so ihre Identität zu verschleiern. Die Profile umfassten künstlich hergestellte Proben an der Assay-Nachweisgrenze (n=3), sowie gerade eben unterhalb der Nachweisgrenze (z. B. hoch negative Proben, n=3). Außerdem umfassten die Profile uncharakterisierte positive (n=2) und negative (n=2) Proben. Die Testdurchführung erfolgte an jedem Standort fünf Tage lang (Schwankungen von Assay zu Assay) durch verschiedene Benutzer pro Tag (Schwankungen innerhalb eines Assays). Drei ***illumi**gene C difficile* Kitchargennummern wurden für die Studie benützt. Die Testergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

| | Ort 1 | | Ort 2 | | Ort 3 | | Gesamt | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Probentyp | Prozentige Übereinstimmung | | Prozentige Übereinstimmung | | Prozentige Übereinstimmung | | Prozentige Übereinstimmung | |
| Negativ | 20/20 | 100 % | 20/20 | 100 % | 19/19**** | 100 % | 59/59 | 100 % |
| Hoch negativ | 25/30 | 83 % | 29/30 | 97 % | 28/30 | 93 % | 82/90 | 91 % |
| Schwach positiv | 30/30 | 100 % | 30/30 | 100 % | 30/30 | 100 % | 90/90 | 100 % |
| Positiv | 20/20 | 100 % | 20/20 | 100 % | 20/20 | 100 % | 60/60 | 100 % |

**** Eine Probe hat ein ungültiges Instrumentergebnis ergeben

**STUDIEN ZUR KREUZREAKTIVITÄT**

Es wurden Kreuzreaktivitätsstudien mit positiven und negativen Stuhlproben durchgeführt, die mit Bakterien oder Pilzen in Endkonzentrationen bis zu 1,2 x $10^8$ bzw. mit Virenkonzentrationen bei einem Minimum von1 x $10^{5,06}$ $TCID_{50}$/mL beimpft waren. Keine der folgenden, im Stuhl vorhandenen Organismen reagierte mit ***illumi**gene C. difficile*: *Aeromonas hydrophila, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Citrobacter freundii, Clostridium sordellii, Clostridium perfringens, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Escherichia coli O157:H7, Escherichia fergusonii, Escherichia hermannii, Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Lactococcus lactis, Listeria monocytogenes, Peptostreptococcus anaerobius, Plesiomonas shigelloides, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Salmonella* Gruppen B-E, *Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Shigella boydii, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica,* Adenovirus Typen 40 und 41, Coxsackievirus, Echovirus, Rotavirus.

**STÖRSUBSTANZEN-TESTS**

Die folgenden Substanzen zeigten in den angegebenen gesättigten Lösungen/Verdünnungen und den aufgeführten Endkonzentrationen keine Auswirkungen auf die Testergebnisse: Bariumsulfat (5 mg/mL), Stuhlfette (entsprechend 2,65 mg Stearinsäure plus 1,3 mg Palmitinsäure pro mL), Hämoglobin (in Form von Methämoglobin) (3,2 mg/mL), IgA (5 mg/mL). Imodium AD® (0,00667 mg/mL), Kaopectate® (0,87 mg/mL), Metronidazole (12,5 mg/mL), Mucin (3,33 mg/mL) Mylanta® (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (0,87 mg/mL), Prilosec® (0,5 mg/mL), Tagamet® (0,5 mg/mL), TUMS® (0,5 mg/mL), Vancomycin (12,5 mg/mL), weiße Blutkörperchen (5 % V/V), Vollblut (5 % V/V).

**REFERENCES**


1. Nagamine K, Hase T, Notoni T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifications using loop primers. Mol Cell Probes 2002;16:223-29.
2. Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notoni T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantitating template DNA. J Biochem Biophys 2004;59:145-47.
3. Rupnik M. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of Clostridium difficile toxinotypes. Microbiol Rev 2008;32:541-55.
4. US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
5. CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2006.
6. Wilkins TD, Lyerly DM. Clostridium difficile testing: after 20 years, still challenging. J Clin Microbiol 2003;41:531-4.
7. Johnson S, Gerding DN. Clostridium-difficile-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1998;26:1027-34.
8. Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. Clostridium difficile: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1988;1:1-18.



**SN11176** **REV. 07/10**



Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
USA/Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244
Telephone: (513) 271-3700
Orders/Customer Service:
(800) 543-1980
Technical Support Center:
(800) 343-3858
Information Fax:(513) 272-5432
Ordering Fax:(513) 271-0124

EC REP
Authorized Representative

Meridian Bioscience Europe
Via dell' Industria, 7
20020 Villa Cortese (MI)
Italy
Tel.: +39 0331 433636
Fax: +39 0331 433616
e-mail: info@mdeur.com

Meridian Bioscience Europe France
Le Quadra
455, Promenade des Anglais
06299 Nice Cedex-3
France
Tel.: +33 (4) 93 18 72 10
Fax: +33 (4) 93 18 72 11
e-mail: info@meridianbioscience.fr

Meridian Bioscience Europe s.a. / n.v.
Rue de l'Industrie 7
1400 Nivelles
Belgium
Tel.: +32 (0) 67 89 59 59
Fax: +32 (0) 67 89 59 58
e-mail: info@mdeur.be

Meridian Bioscience Europe b.v.
Halderheiweg 6
5282 SN Boxtel
The Netherlands
Tel.: +31 (411) 621166
Fax: +31 (411) 624841
e-mail: meridian.info@planet.nl

**INTERNATIONAL SYMBOL USAGE**

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

**Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symbols, Guia de simbolos, Erläuterung der graphischen symbole)**

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis | CONTROL + | Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle |
| LOT | Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung | CONTROL − | Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle |
| IVD | In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum | SMP PREP DIL SPE | Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Apparato per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet |
| CE | This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG. | EC REP | Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft |
| REF | Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer | 0°C | Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren |
| | Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten | RoHS | Restriction of Hazardous Substances / Restrizione all'uso di sostanze pericolose / Limitation de substances dangereuses / Restricción de Substancias Nocivas / Beschränkung der Verwendung bestimmter gefährlicher Stoffe |
| | Manufacturer / Fabbricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller | | Caution, consult accompanying documents / Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso / Attention voir notice d'instructions / Atención, ver instrucciones de uso / Achtung, Begleitdokumente beachten |
| Σ | Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen | BUF RXN | Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer |
| | Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung | C ETL US LISTED | ETL Registered Mark Certified / Marchio di certificazione registrato a livello nazionale / Certifié Conforme ETL / Marca de Certificación Registrada Nacional / ETL Konform beglaubigt |
| SN | Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer | | Recycle – do not dispose of as general waste / Riciclare – non eliminare come rifiuto generico / Recycler – ne pas jeter dans une poubelle / Recicle – no deseche como basura general / Recycling- dieses Produkt nicht über den Hausmüll entsorgen |
| TEST | Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät | EX TUBE | Extraction tube / Provette per l'estrazione / Tubes d'Extraction / Tubo de Extración / Röhrchen zur Probenextraktion |
| | Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum | ? | For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD reservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung |
| | LASER RADIATION: Avoid Exposure to Beam / RADIAZIONE LASER: Evitare l'esposizione al raggio / RAYONNEMENT LASER: Eviter toute exposition au faisceau / Radiación Laser: Evite Exposición a los Rayos / LASERSTRAHLUNG: Direkten Kontakt mit dem Strahl vermeiden | | HOT SURFACE: Keep hands Away from Hot Surfaces / Superficie calda: tenere le mani lontane dalle superfici calde / SURFACES CHAUDES: Ne pas toucher les surfaces chaudes / Superficie Caliente: Mantenga las manos alejadas de la superficie caliente / Heiße Oberfläche: Kontakt mit heißen Oberflächen vermeiden |
| CAUTION | CAUTION: Laser Radiation / ATTENZIONE: Radiazione Laser / AVERTISSEMENT: Rayonnement laser / Precaución: Radiación Laser / WARNUNG: Laserstrahlung | IPX-0 | CAUTION: Protect from water / ATTENZIONE: Proteggere dall'acqua / AVERTISSEMENT: Protéger de l'humidité / Precaución: Proteja del agua / WARNUNG: Vor Feuchtigkeit schützen |
| | CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Risikogefahr | | |

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.